

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



## **TESIS DOCTORAL**

Repercusiones funcionales de la interacción entre mutantes del canal  
Nav.1.5 responsables del síndrome de Brugada y los canales kir2.x

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Pérez-Hernández Durán

Directores

Juan Tamargo Menéndez  
Eva Delpón Mosquera  
Ricardo Caballero Collado

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**REPERCUSIONES FUNCIONALES DE LA  
INTERACCIÓN ENTRE MUTANTES DEL CANAL  
Nav1.5 RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE  
BRUGADA Y LOS CANALES Kir2.x**

**TESIS DOCTORAL**

**Marta Pérez-Hernández Durán**

**DIRECTORES**

**Prof. Juan Tamargo Menéndez**

**Prof. Eva Delpón Mosquera**

**Prof. Ricardo Caballero Collado**

**Madrid, 2017**



## **AGRADECIMIENTOS**





*“Es la lucha contra lo desconocido..., es la extensión natural de la imaginación”.*

Borges

Después de 5 años en este laboratorio, de los cuales unos meses dedicados a la escritura de esta Tesis Doctoral, me asaltan los recuerdos, tanto los buenos como alguno malo (¡esos viernes hasta tarde en los que no salen los Western blot!). Pero la mayoría surgen de la gratitud: gratitud por lo que me han dado otros y por que, sin ellos, seguramente no podría haber llegado hasta aquí.

En primer lugar, a mis directores de Tesis, los profesores Juan Tamargo Menéndez, Eva Delpón Mosquera y Ricardo Caballero Collado.

Al Profesor Juan Tamargo Menéndez, por acogerme y apostar por mí. Ha sido un honor y un placer trabajar con semejante terremoto de sabiduría. Muchas gracias Juan por haberme brindado esta oportunidad.

A la Profesora Eva Delpón Mosquera, por ser la cabeza pensante, el alma del laboratorio, y por que, a pesar de las adversidades, siempre está al pie del cañón y consigue que salga todo adelante.

Al Profesor Ricardo Caballero Collado, por que siempre está dispuesto a ayudar, y por ser un estupendo profesor y mejor persona.

A los tres, gracias por sacar siempre tiempo de donde no lo hay para echar una mano. Da gusto trabajar en un sitio así.

Sin duda, si a alguien debo estar agradecida es a mis compañeros de laboratorio. A Paloma por alegrarnos las mañanas con sus historias infinitas. A los presentes cuando llegué al laboratorio, Sandris (espero mi tarta de zanahoria), Ire y Adri (las súper escaladoras a las que debo tanto, dentro y fuera del labo), Marcos (la fábrica de cerveza más famosa del Departamento); y con los que no tuve ocasión de coincidir tanto: Pablo, Marta, Ricardo Gómez y Mercedes, gracias por enseñarme el arte del patch y por todas las horas pasadas averiguando que hacían el sodio y el potasio juntos. A las nuevas (no tan nuevas ya) incorporaciones: Raquel, no dejes de contar tus historias que dan para escribir un libro y que tu buen humor no se ve enturbiado por nada; David, el dj *gentleman*; Paloma, roba puestos de

mejor amiga; Silvia, la pastelera oficial y Lore, por su buen humor. Los pinchauvas, chimpáticos, Mocedades, Telepizza y todo lo que se os ocurra de estos últimos años: os deseo todo lo mejor pero, sobre todo, espero seguir de cerca vuestras aventuras científicas y personales. Ya sabéis lo que dice mi canción “*Como olvidarme de Marta...*”.

Quiero agradecer a mi familia todo lo que me han apoyado. A mi madre, que es mi mayor admiradora, y guarda una carpeta con todos mis artículos a pesar de no entender ni el título. A mi padre, por haberme apoyado desde el principio aunque la ciencia sea algo ajeno para él. A mis hermanos, por que con su ejemplo han hecho de mi una mejor persona (a Cuca una mención especial por ser mi espejo, mi alma gemela, a veces tan parecidas y otras tan poco). Y como no, a mi abuelo, por que de algún lado tenía que heredar el espíritu curioso.

No me olvido de los incondicionales: A mi ángel de la guarda, Álvaro, por los ánimos, los “mocitos”, las traducciones, por que siempre estás allí para lo bueno y lo malo. A Jaime por ser el Hakuna Matata de mi vida y estar convencido que ganaré el Premio Nobel. A Borja por ser mi *neopinci* definitivo, y ser el mejor apoyo del mundo (y a la pequeña Matilda). A mis amigas, que después de 5 años siguen preguntándome que hago al llegar al laboratorio y me creen Einstein. Gracias a todos, de corazón.

Como no, de mis estancias guardo maravillosos recuerdos, y creo que ha sido una oportunidad inceíble para crecer tanto profesional como personalmente. Agradezco especialmente al Prof Jalife por haberme acogido en el *Center for Arrhythmia Research* en Ann Arbor, a Daniela, a Guadalupe, a Roberto, a Cicero, a Randall, a Todd y a Kate; de mi estancia en Berna al Prof Abriel por acogerme, y a Sarah por enseñarme lo que estaba en sus manos.

Por supuesto una mención especial al Prof Díez-Guerra y al servicio de microscopía del CBMSO por la valiosísima ayuda brindada.

Aprovecho también para agradecer a la Prof María Isabel Colado, Directora del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid por haberme acogido amablemente en el Departamento. Y por supuesto a toda la gente del Departamento, los chicos del Prof. Ignacio Lizasoain, Prof. Ángel Cogolludo, Prof. Francisco Pérez-Vizcaino, y Prof. Juan Carlos Leza, por el “mercado negro” de anticuerpos.

Y como dijo Francis Crick “*Todo lo que tiene un principio tiene que tener un final*” y aunque queda mucho por descubrir, espero haber aportado mi granito de arena a la ciencia y a la sociedad, y sobre todo, poder seguir haciéndolo. Aunque acabe una etapa, empieza otra.



## **ABREVIATURAS**



$\epsilon_r$ : constante dieléctrica de la membrana	ARN: Ácido ribonucleico
$\Psi$ : aminoácido hidrofóbico	ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
$\lambda_{em}$ : Longitud de onda de emisión	AP1: Proteína adaptadora 1
$\lambda_{ex}$ : Longitud de onda de excitación	AsODN: Oligonucleótidos antisentido
4-AP: 4-Aminopiridina	ATP: Adenosín trifosfato
ACh: Acetilcolina	AV: Aurículo-ventricular
AD: Aurícula derecha	BCA: Ácido bicinconínico
Ad: Adenovirus	BDM: 2,3-Butanodiona monoxima
ADN: Ácido desoxirribonucleico	BFA: Brefeldina A
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario	BSA: Albúmina de suero bovino
ADP: Adenosín bifosfato	$[Ca^{2+}]_{e/i}$ : Concentración extra/intracelular de $Ca^{2+}$
AI: Aurícula izquierda	CaM: Calmodulina
AKAP: Proteína de anclaje para la PKA	CaMKII: Proteína cinasa II dependiente de $Ca^{2+}$ /CaM
Aminoácidos	CASK: proteína cinasa calcio/calmodulin-dependiente de serina
A (Ala): Alanina	Cav3: Caveolina-3
C (Cys): Cisteína	CBMSO: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
D (Asp): Ácido aspártico	CHO: Células de ovario de hámster chino ( <i>Chinese Hamster Ovary cells</i> )
E (Glu): Ácido glutámico	$C_m$ : Capacitancia de la membrana celular
F (Phe): Fenilalanina	CNIC: Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III
G (Gly): Glicina	COPI o II: <i>coat complex protein</i> I o II
H (His): Histidina	COS: ( <i>CV-1 in Origin with SV40 genes</i> ). Referido a células derivadas de fibroblastos de mono
I (Ile): Isoleucina	cp173Venus: Permutación circular en el aa 173 de Venus ( <i>Venus circular permutation 173</i> )
K (Lys): Lisina	C-terminal: Carboxilo-terminal
L (Leu): Leucina	Cx43: Conexina 43
M (Met): Metionina	D: Dominio
N (Asn): Asparagina	DAPC: Complejo asociado a distrofina ( <i>Dystrophin-associated protein complex</i> )
P (Pro): Prolina	DCI: Desfibrilador cardioversor implantable
Q (Gln): Glutamina	DCP: Dominio citoplasmático
R (Arg): Arginina	DE: Desviación estándar
S (Ser): Serina	DHP: 1,4-Dihidropiridinas
T (Thr): Treonina	DIA: Dominio de interacción $\alpha$ del canal de $Ca^{2+}$
V (Val): Valina	DIB: Dominio de interacción $\beta$ del canal de $Ca^{2+}$
W (Trp): Triptófano	
Y (Tyr): Tirosina	
Acc. no.: <i>Accession number</i> . Referido al código asignado a una secuencia de ADN o proteína	
AMPC: Adenosín monofosfato cíclico	
ANOVA: Análisis de la varianza	



DMEM: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	hERG: <i>Human Ether-à-go-go Related Gene</i>
DPA: Duración del potencial de acción	hiPSC-CM: miocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas humanas
DPA <sub>n</sub> : DPA medida al n % de la repolarización	hKir2.x: Kir2.x humano
DPP: Proteínas dipeptidilpeptidasas	hNav1.5: Nav1.5 humano
dsRNA: ARN de doble cadena ( <i>double stranded RNA</i> )	hNavβ1: Subunidad β1 del canal de sodio cardíaco humano
DTM: Dominio transmembrana	HPTX: Toxina heteropoda
DTX: Dendrotoxina	HRP: Peroxidasa de rábano ( <i>horseradish peroxidase</i> )
E: Potencial transmembrana	HTA: Hipertensión arterial
ECG: Electrocardiograma	HVA: <i>High-Voltage Activated</i>
ECL: Quimioluminescencia potenciada ( <i>Enhanced ChemiLuminescence</i> )	I: Intensidad de corriente macroscópica
EDN: Efecto Dominante Negativo	I <sub>Ca</sub> : Corriente de entrada de Ca <sup>2+</sup>
EEM: Error estándar de la media	I <sub>Ca,L</sub> / I <sub>Ca,T</sub> : I <sub>Ca</sub> generada por canales tipo L/tipo T
E <sub>K</sub> : Potencial de Nernst para el K <sup>+</sup>	ICC: insuficiencia cardíaca congestiva
E <sub>m</sub> : Potencial de membrana	I <sub>f</sub> : Corriente hiperpolarizante marcapasos ( <i>funny current</i> )
E <sub>Na</sub> : Potencial de Nernst para el Na <sup>+</sup>	Ig: Inmunoglobulina
Endo: Endocardio	I <sub>K1</sub> : Corriente de K <sup>+</sup> con rectificación interna
Epi: Epicardio	I <sub>K,ACh</sub> : Corriente de salida de K <sup>+</sup> activada por ACh
F: Constante de Faraday (9.65x10 <sup>4</sup> C/mol)	I <sub>K,ATP</sub> : Corriente de K <sup>+</sup> sensible a ATP
FA: Fibrilación auricular	I <sub>Kir2</sub> : Corriente de K <sup>+</sup> generada por canales Kir2
FBS: suero fetal bovino	I <sub>Kr</sub> : Corriente rectificadora tardía de K <sup>+</sup> de activación rápida
FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos	I <sub>Ks</sub> : Corriente rectificadora tardía de K <sup>+</sup> de activación lenta
FITC: <i>fluorescein-isothiocyanate</i>	I <sub>Kur</sub> : Corriente rectificadora tardía de K <sup>+</sup> de activación ultrarrápida
FRAP: <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>	I <sub>Na</sub> : Corriente de entrada de Na <sup>+</sup>
fs: <i>Frame-shift</i> . (Desplazamiento del marco de lectura)	I <sub>Na,L</sub> : Corriente tardía de entrada de Na <sup>+</sup>
FV: Fibrilación ventricular	[ion] <sub>e/i</sub> : Concentración extra/intracelular del ion
ΔG: Energía de Gibbs	I <sub>tot1</sub> : Corriente transitoria de salida de K <sup>+</sup> cardíaca
G: Conductancia	I <sub>tot2</sub> : Corriente transitoria de salida de Cl <sup>-</sup> activada por Ca <sup>2+</sup>
GFP: Proteína fluorescente verde	I-V: Relación intensidad de corriente-voltaje
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico	k: Valor de la pendiente de la curva
GPD1-L: <i>Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like</i>	[K <sup>+</sup> ] <sub>e/i</sub> : Concentración extra/intracelular de K <sup>+</sup>
GST: <i>Glutathione S-Transferase</i>	K <sub>ACh</sub> : Canales de K <sup>+</sup> activados por ACh
GUK: Referido a dominio guanilato quinasa en SAP97	
[H <sup>+</sup> ] <sub>i</sub> : Concentración intracelular de protones	
HEK293: Células embrionarias humanas de riñón ( <i>Human Embryonic Kidney cells</i> )	
HEPES: Ácido N-Hidroxietilpiperacina-N'-etanesulfónico	

K <sub>Ca</sub> : Canales de K <sup>+</sup> activados por Ca <sup>2+</sup>	<i>occludens</i>
KChAP: K <sup>+</sup> Channel-Associated Protein	PFA: Paraformaldehído
KChIP: Kv Channel Interacting Protein	PH: Dominio homólogo a plectrina
Kir: Canales de K <sup>+</sup> rectificadores internos	PIP <sub>2</sub> : Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
Kv: Canales de K <sup>+</sup> dependientes de voltaje	PKA: Proteína cinasa dependiente de AMPc
LJP: <i>Liquid Junction Potencial</i>	PKC: Proteína cinasa C
LVA: <i>Low-Voltage Activated</i>	PKP2: Placofilina-2
MAGUK: Guanilato-Cinasa asociada a membrana	PMA: Miristato-acetato de forbol ( <i>Phorbol Myristate Acetate</i> )
<i>mdx</i> : Referido a ratones deficientes en distrofina	PR: Potencial de reposo
minK: <i>Minimal K<sup>+</sup> channel subunit</i>	PSD: proteína de densidad post-sináptica
miRNA: micro ARN	<i>Q</i> : Carga
MiRP: <i>MinK-Related Peptides</i>	<i>R</i> : Constante universal de los gases (8.31 J/mol·K)
MOG1: <i>Multicopy suppressor of gsp-1</i>	RE: Retículo endoplásmico
MOI: Multiplicidad de infección ( <i>Multiplicity of infection</i> )	RIPA tampón: <i>RadioImmunoPrecipitation Assay buffer</i>
mTq2: <i>monomeric Turquoise 2</i> . Referido a variante de la CFP	rpm: Revoluciones por minuto
[Na <sup>+</sup> ] <sub>e/i</sub> : Concentración extra/intracelular de Na <sup>+</sup>	<i>RNAi</i> : ARN de interferencia
NBD: Dominios de unión de nucleótidos	ROI: región de interés
NDS: Detergente neutro soluble	RS: Ritmo sinusal
NIH: <i>Nacional Institutes of Health</i>	RyR2: Receptor/canal de rianodina tipo 2
nNOS: ( <i>Neuronal nitric oxide synthase</i> ). Óxido nítrico sintasa neuronal	SA: Senoauricular
NO: Óxido nítrico	SAT: Síndrome de Andersen-Tawil
N-terminal: Amino-terminal	SBr: Síndrome de Brugada
<i>P<sub>ion</sub></i> : Permeabilidad de la membrana a un determinado ion	SDS-PAGE: <i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
<i>P<sub>o</sub></i> : Probabilidad de apertura del canal	SH3: Referido a dominio SH3 de SAP97 ( <i>Src homology 3</i> )
PA: Potencial de acción	<i>shRNA</i> : <i>short hairpin RNA</i> .
PBS: Tampón Fosfato Salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )	<i>siRNA</i> : <i>small interference RNA</i> .
PBS-T: PBS con Tween20	SJLN: Síndrome de Jervell y Lange-Nielsen
PCCD: Enfermedad progresiva del sistema de conducción Cardíaco	SNC: Sistema nervioso central
PCMA: <i>Plasma membrana calcium ATPase</i>	SNP: Sistema nervioso periférico
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )	SQTC: Síndrome de QT corto
PDMS: polidimetilsiloxano	SQTL: Síndrome de QT largo
PDZ: <i>Post synaptic density, Discs large, and Zonula</i>	SrcH-3: Referido a dominio de SAP97 ( <i>Src homology-3</i> )
	SRT: Síndrome de repolarización temprana
	SSE: Síndrome del seno enfermo
	STAT: <i>Signal Transducers and Activators of</i>

*Transcription*

SU: Dominio único de sintrofinas

SUR: Receptor de sulfonilureas

$\tau$ : Constante de tiempo

*T*: Temperatura absoluta

TdP: *Torsade de Pointes*

TEA: Tetraetilamonio

TGX: *Tris-Glycine eXtended*

TM: Transmembrana (segmento)

TRITC: *tetramethylrhodamine isothiocyanate*

TTX: Tetrodotoxina

TVPC: Taquicardia ventricular polimórfica inducida  
por Catecolaminas

*V*: Voltaje

VI: Ventrículo izquierdo

VC: velocidad de conducción

Vh: Punto medio de la curva

VP: Venas pulmonares

WT: *wild type*, nativos, salvajes

WW: Referido a dominio rico en triptófanos

## **ÍNDICE**



<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>9</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDIACA .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. Excitabilidad .....</b>	<b>20</b>
1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular .....	22
1.1.2. El potencial de reposo .....	23
1.1.3. El potencial de acción (PA) .....	24
<i>1.1.3.a. PA rápidos o dependientes de <math>Na^+</math> .....</i>	<i>25</i>
<i>1.1.3.b. PA lentos o dependientes de <math>Ca^{2+}</math> .....</i>	<i>27</i>
<b>1.2. Automatismo .....</b>	<b>27</b>
<b>1.3. Refractariedad.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4. Propagación del impulso cardiaco .....</b>	<b>28</b>
<b>2. CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE IMPLICADOS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO HUMANO .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Canales de <math>Na^+</math> .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2. Canales de <math>Ca^{2+}</math> .....</b>	<b>31</b>
2.2.1. Estructura de los canales de $Ca^{2+}$ .....	32
2.2.2. Características de la $I_{Ca,L}$ .....	34
<b>2.3. Canales de <math>K^+</math> voltaje dependientes .....</b>	<b>35</b>
2.3.1. Canales 6TM/1P.....	36
2.3.1.a. Estructura de los canales $K_v$ .....	37
I. La subunidad $\alpha$ .....	37
II. Subunidades auxiliares .....	38
2.3.1.b. Principales corrientes generadas a través de canales $K_v$ que intervienen en el PA cardiaco .....	40
I. La $I_{to}$ .....	40
II. La $I_{Kur}$ .....	42
III. La $I_{Kr}$ .....	43
III.a. Características de la $I_{Kr}$ .....	44

III.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kr}$ .....	45
IV. La $I_{Ks}$ .....	46
IV.a. Características de la $I_{Ks}$ .....	46
IV.b. Composición de los canales que generan la $I_{Ks}$ .....	47
<b>3. CANALES QUE GENERAN CORRIENTES CON RECTIFICACIÓN INTERNA</b> ....	48
3.1. Una familia de canales de $K^+$ con rectificación interna .....	48
3.2. La rectificación interna en los canales Kir.....	50
3.2.1. Mecanismos moleculares de la rectificación interna .....	52
3.2.2. Determinantes moleculares de la rectificación interna .....	52
3.3. Estructura de los canales Kir.....	55
3.4. Principales corrientes cardiacas generadas a través de canales Kir .....	62
3.4.1. La $I_{K,ATP}$ .....	62
3.4.1.a. Características de la $I_{K,ATP}$ y composición de los canales que la generan .....	62
3.4.1.b. Regulación de la $I_{K,ATP}$ .....	63
3.4.2. La $I_{K,ACh}$ .....	64
3.4.2.a. Características de la $I_{K,ACh}$ .....	64
3.4.2.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ACh}$ .....	65
3.4.2.c. Regulación de la $I_{K,ACh}$ .....	66
3.5. La $I_{K1}$ .....	66
3.5.1. Rectificación interna y excitabilidad cardiaca .....	67
3.5.2. Densidad de la $I_{K1}$ en los distintos tejidos cardiacos.....	68
3.5.3. Propiedades de los canales Kir2.....	70
3.5.4. Composición de los canales que generan la $I_{K1}$ .....	71
3.5.5. Regulación de la $I_{K1}$ .....	73
3.5.6. La $I_{K1}$ en diversas patologías .....	79
<b>4. CANALES DE <math>Na^+</math></b> .....	85
4.1. Estructura de los canales de $Na^+$ .....	85
4.2. Características de la $I_{Na}$ .....	89
4.3. Biología de los canales Nav1.5: su tráfico .....	92
4.3.1. Regulación del ARNm .....	92
4.3.2. Mecanismos de tráfico del RE a Golgi .....	93

4.3.3. Motores moleculares y microtúbulos.....	94
4.3.4. Inserción de los canales en la membrana.....	95
4.3.5. Endocitosis .....	96
4.4. Proteínas reguladoras del tráfico de Nav1.5 y modificaciones post-traduccionales.....	97
4.5. Canalopatías asociadas a los canales de Na <sup>+</sup> cardiacos .....	102
<b>5. CANALOSOMAS DE CANALES Kir2.x-Nav1.5 .....</b>	<b>113</b>
5.1. Definición de canalsoma.....	113
5.2. Canalsomas de canales Nav1.5 .....	114
5.3. Distribución de los canales Nav1.5 en los miocitos cardiacos .....	121
5.3.1. Definición de polaridad.....	121
5.3.2. Distintas poblaciones de canales Nav1.5 .....	123
5.4. Canalsomas formado por canales Kir2.1/2.2-Nav1.5 .....	127
5.4.1. Modulación recíproca positiva Kir2.1-Nav1.5 .....	127
5.4.2. Proteínas implicadas en el tráfico y localización de los canales Kir2.1-Nav1.5 .....	130
5.4.3. Consecuencias clínicas.....	132
<b>6. ARRITMIAS POR REENTRADA DEL IMPULSO CARDIACO .....</b>	<b>133</b>
6.1. Conceptos básicos .....	133
6.2. Evolución de las teorías de reentrada .....	134
6.3. Los rotors en la génesis de la FA .....	138
6.4. Papel de los canales iónicos .....	141
6.5. Futuro, implicaciones y perspectivas.....	144
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>145</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>149</b>
<b>1. TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE EN PARCHE DE MEMBRANA (PATCH-CLAMP) .....</b>	<b>151</b>
<b>2. REGISTRO DE <math>I_{Kir2.x}</math> E <math>I_{Nav1.5}</math> EN SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGOS ...</b>	<b>154</b>



2.1 Mutagénesis dirigida de los canales hKir2.x y hNav1.5.....	154
2.2. Cultivo y transfección de los canales hKir2.x y hNav1.5 en células CHO.....	155
2.3. Silenciamiento de GRASP55 en células CHO.....	157
2.4. Técnicas de registro en sistemas de expresión heterólogos .....	158
2.5. Registro de la $I_{Kir2.x}$ e $I_{Nav1.5}$ : Soluciones y protocolos experimentales.....	159
<b>3. REGISTRO DE <math>I_{K1}</math> E <math>I_{Na}</math> EN MIOCITOS VENTRICULARES DE RATA ADULTA...</b>	<b>160</b>
3.1. Disociación enzimática de miocitos ventriculares de rata .....	160
3.2. Cultivo e infección de miocitos ventriculares de rata .....	161
3.3. Técnicas de registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ ventriculares de rata.....	162
3.4. Registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ ventriculares de rata: Soluciones y protocolos experimentales .....	163
<b>4. REGISTRO DE LA <math>I_{K1}</math> E <math>I_{Na}</math> EN MIOCITOS VENTRICULARES DE RATÓN.....</b>	<b>164</b>
4.1. Disociación enzimática de miocitos ventriculares de ratón .....	164
4.2. Técnicas de registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ ventriculares de ratón .....	165
4.3. Registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ : Soluciones y protocolos experimentales.....	165
<b>5. REGISTRO DE LA <math>I_{K1}</math>, <math>I_{Na}</math> Y PAs EN MIOCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS HUMANAS (hiPSC) .....</b>	<b>166</b>
5.1. Obtención de los miocitos derivados de hiPSC .....	166
5.2. Diferenciación, cultivo e infección de los miocitos derivados de hiPSC .....	167
5.3. Técnicas de registro de la $I_{K1}$ , $I_{Na}$ y PAs en hiPSC-CM.....	167
5.4. Registro de la $I_{K1}$ , $I_{Na}$ y PAs: Soluciones y protocolos experimentales.....	168
<b>6. EXPERIMENTOS DE <i>WESTERN BLOT</i> .....</b>	<b>169</b>
6.1. Extracción proteica de células CHO transfectadas .....	169
6.2. Cuantificación de proteínas.....	170
6.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida, transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección .....	170
<b>7. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA .....</b>	<b>171</b>

7.1. Experimentos de inmunocitoquímica.....	171
7.2. Determinación de la expresión de Kir2.1 y Nav1.5 en membrana .....	172
7.2.1. Construcción de quimeras .....	172
7.2.2. Cultivo, transfección y fijación de células HEK293 .....	173
7.2.3. Microscopía confocal y análisis de imagen .....	174
<b>8. RECUPERACIÓN DE LA FLUORESCENCIA POSTERIOR AL FOTO-BLANQUEAMIENTO (FRAP) .....</b>	<b>174</b>
<b>9. ANTICUERPOS, COMPUESTOS Y OTROS PLÁSMIDOS .....</b>	<b>176</b>
9.1. Anticuerpos .....	176
9.2. Compuestos y otros plásmidos .....	176
<b>10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>177</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>179</b>
<b>1. LA MODULACIÓN POSITIVA ENTRE CANALES Kir2.1 Y Nav1.5 CARDIACOS SE DEBE A UNA INTERACCIÓN ENTRE AMBOS .....</b>	<b>181</b>
1.1. Identificación mediante microscopía confocal de la colocación de los canales Kir2.1 y Nav1.5 .....	181
1.2. Colocalización de los canales Kir2.1 con Nav1.5 en miocitos ventriculares de rata.....	183
<b>2. EFECTO DE MUTACIONES EN EL CANAL Nav1.5 SOBRE LA MODULACIÓN POSITIVA .....</b>	<b>186</b>
2.1. Características de los mutantes del canal Nav1.5 estudiados .....	186
2.1.1. Mutantes de Nav1.5 seleccionados .....	187
2.1.2. Características de las corrientes generadas por las mutaciones p.D1690N, p.G1748D, y p.D1816VfsX7 .....	188
2.2. Efecto de los mutantes p.G1748D, p.D1690N y p.D1816VfsX7 sobre la $I_{Nav1.5}$ e $I_{Kir2.x}$ en células CHO .....	189
2.2.1. Efecto de los mutantes del canal Nav1.5 sobre la $I_{Kir2.1}$ .....	190
2.2.2. Efecto de los mutantes del canal Nav1.5 sobre la $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$ .....	192

2.2.3. Efectos de la cotransfección de canales Kir2.2 o Kir2.3 y Nav1.5 WT sobre $I_{Nav1.5}$ ..	193
2.2.4. Efectos de la cotransfección de canales Kir2.x sobre la $I_{Nav1.5}$ generada por mutantes Nav1.5 con déficit de función .....	194
2.3. Efecto de las mutaciones p.D1690N, p.G1748D y p.D1816VfsX7 sobre la $I_{Na}$ e $I_{K1}$ en miocitos ventriculares de rata .....	195
2.3.1. Efecto de las mutaciones p.D1690N, p.G1748D y p.D1816VfsX7 sobre la $I_{Na}$ .....	196
2.3.2. Efecto de las mutaciones p.D1690N, p.G1748D y p.D1816VfsX7 sobre la $I_{K1}$ .....	197
2.4. La mutación p.G1748D produce EDN sobre la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ en hiPSC-CM .....	198
2.5. Modulación recíproca positiva en un cruce de ratones $KCNJ2$ OE <sup>+/+</sup> -SCN5A <sup>+/+</sup> .....	203
<b>3. POSIBLE MECANISMO RESPONSABLE DE LA VARIABILIDAD DE EFECTOS SOBRE LA MODULACIÓN POSITIVA OBSERVADA ENTRE LAS MUTACIONES DEL CANAL Nav1.5 ESTUDIADAS .....</b>	<b>207</b>
3.1. Relación entre el efecto producido por los distintos mutantes del canal Nav1.5 sobre la $I_{K1}$ y el compartimento intracelular donde se quedan retenidos .....	207
3.1.1. Efecto de mutaciones en el canal Kir2.1 sobre la modulación positiva de la $I_{Nav1.5}$ ....	207
3.1.2. El mutante del canal Nav1.5 p.D1690N queda retenido en el RE mientras que p.G1748D en el Golgi.....	209
3.1.2.a. Mecanismos de rescate de mutantes.....	209
3.1.2.b. Inmunofluorescencia de los mutantes p.D1690N y p.G1748D.....	211
3.2. ¿Cómo alcanzan la membrana los canales Nav1.5 y Kir2.1? .....	214
3.2.1. Inhibición del tráfico del RE a Golgi mediante incubación con BFA .....	218
3.2.2. Tráfico no convencional de los canales Kir2.1-Nav1.5 mediado por GRASP55 .....	220
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>223</b>
<b>1. LOS CANALES Kir2.1 INTERACCIONAN CON LOS CANALES Nav1.5 FORMANDO UN CANALOSOMA .....</b>	<b>225</b>
<b>2. ESTUDIO DE LOS MUTANTES DEL CANAL Nav1.5 .....</b>	<b>226</b>
2.1. Efectos sobre la modulación positiva.....	226
2.2. EDN de los mutantes de Nav1.5 sobre los canales Kir2.1.....	227
2.3. Retención de los mutantes del canal Nav1.5 en RE o Golgi.....	229

<b>3. TRÁFICO NO CONVENCIONAL MEDIADO POR GRASP .....</b>	<b>230</b>
<b>3.1. Direccionalidad .....</b>	<b>233</b>
<b>3.2. Patrón de glicosilación .....</b>	<b>234</b>
 <b>4. IMPLICACIONES CLÍNICAS .....</b>	<b>234</b>
 <b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>237</b>
 <b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>241</b>
 <b>VIII. PUBLICACIONES.....</b>	<b>279</b>



## **RESUMEN**



## REPERCUSIONES FUNCIONALES DE LA INTERACCIÓN ENTRE MUTANTES DEL CANAL Nav1.5 RESPONSABLES DEL SÍNDROME DE BRUGADA Y LOS CANALES Kir2.x

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El síndrome de Brugada (SBr) se caracteriza por la elevación del ST en los registros electrocardiográficos de las derivaciones precordiales derechas y la predisposición a presentar arritmias ventriculares y muerte súbita. El SBr se transmite característicamente según un patrón de herencia autosómico dominante. Hasta un 30% de los pacientes genotipados tienen una mutación en el gen *SCN5A*, que codifica para la subunidad  $\alpha$  del canal Nav1.5 cardíaco, que, junto a subunidades auxiliares (Nav $\beta$ ), es responsable de la corriente rápida de entrada de Na ( $I_{Na}$ ). Estas mutaciones codifican canales Nav1.5 que tras su síntesis no alcanzan la membrana de los miocitos cardíacos o/y que tienen alteraciones en los mecanismos dependientes de tiempo y voltaje que determinan la conductancia del canal (*gating*). El resultado es que los canales mutados o no son capaces de generar corriente o generan corrientes significativamente menores a las generadas por canales nativos (canales con “déficit” de función).

La  $I_{Na}$  determina la excitabilidad y la conducción cardíacas. Por otro lado, la corriente de potasio con rectificación interna ( $I_{K1}$ ) determina la duración de la fase final del potencial de acción cardíaco y del periodo refractario y establece el potencial de reposo del que depende la magnitud de la  $I_{Na}$ . La  $I_{K1}$ , por tanto, juega un papel crítico para controlar la refractariedad y la excitabilidad cardíacas. La  $I_{K1}$  cardíaca humana es generada por canales Kir2.x que están distribuidos diferencialmente entre aurícula y ventrículo. Los homotetrámeros de Kir2.1 son los principales generadores de la  $I_{K1}$  en los ventrículos humanos, pero Kir2.2 y sobre todo Kir2.3 juegan un papel fundamental en la generación de la  $I_{K1}$  en las aurículas. Recientemente se ha demostrado que existe una modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y Kir2.1/Kir2.2. Así, el aumento en la expresión/actividad de canales Kir2.1 o Kir2.2 produce un aumento en la expresión/actividad de canales Nav1.5 y *viceversa*. Además, se ha demostrado que la presencia de canales Kir2.3 en los tetrámeros que generan la  $I_{K1}$  suprime la modulación recíproca positiva con los canales Nav1.5. Por tanto, a nivel auricular humano, no se produce modulación recíproca positiva entre la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$ .



En el momento actual se desconoce qué ocurre con la expresión de canales Kir2.x, y por tanto con la densidad de la  $I_{K1}$  ventricular, en pacientes con mutaciones en *SCN5A* que generan canales con déficit de función. Se desconoce también si los canales Kir2.x son capaces de restaurar la expresión en membrana de los canales Nav1.5 mutados. Por tanto, sería de interés analizar los efectos de las mutaciones de los canales Nav1.5 asociados al SBr sobre el tráfico de los canales Kir2.x y sobre la  $I_{K1}$ , el potencial de reposo y la duración de los potenciales de acción.

Por todo ello, los objetivos que nos propusimos en la presente Tesis Doctoral fueron:

- 1) Identificar si los canales Nav1.5 y los canales Kir2.1 interaccionan entre sí en sistemas de expresión heterólogos y en miocitos ventriculares de rata.
- 2) Analizar el efecto del déficit de función de los mutantes de los canales Nav1.5 sobre la densidad de la corriente generada por canales Kir2.x y la  $I_{Na}$  en varios modelos celulares (sistemas de transfección heterólogos, miocitos ventriculares de rata, cardiomiocitos derivados de células humanas pluripotentes inducidas -hiPSC-CM-).
- 3) Analizar el efecto del silenciamiento de un alelo del gen *SCN5A* sobre la modulación recíproca positiva en ratones transgénicos.
- 4) Analizar las consecuencias de la presencia de un mutante del canal Nav1.5 con pérdida de función sobre las características de los potenciales de acción generados en hiPSC-CM.
- 5) Identificar el mecanismo de tráfico de Kir2.1-Nav1.5 por el cual se produce la modulación recíproca positiva.

## RESULTADOS

En primer lugar, estudiamos mediante inmunofluorescencia la interacción entre canales Kir2.1 y Nav1.5 en células de ovario de hámster chino (CHO) y en miocitos ventriculares disociados de rata. Los resultados indican que ambos canales colocalizan en membrana lateral y en túbulos T de los miocitos ventriculares junto con la  $\alpha 1$ -sintrofina.

En miocitos ventriculares disociados de ratones *SCN5A*<sup>+/-</sup>, la supresión de un alelo del gen *SCN5A*, que codifica para el canal Nav1.5, produjo una disminución simultánea de la  $I_{Na}$  y de  $I_{K1}$  ventricular. Además, la velocidad de conducción disminuyó, la duración del potencial de acción medida al 80% de la repolarización se acortó, y el potencial de reposo se despolarizó.

Posteriormente analizamos los efectos de los mutantes del canal Nav1.5 sobre la modulación recíproca positiva en células CHO, en miocitos ventriculares disociados de rata, y en hiPSC-CM. En todos los casos, la coexpresión de los canales Kir2.1 WT y Nav1.5 WT produce un aumento de la  $I_{Na}$  y de la  $I_{K1}$  respecto a las corrientes generadas por cada uno de los canales por separado. Mutantes con déficit de función del canal Nav1.5 que son capaces de alcanzar la membrana celular (p.ej. p.R878C o la mutación p.D1690N junto el polimorfismo p.H558R que ejerce de chaperona) modularon positivamente la  $I_{Kir2.1/2.2}$ . Por el contrario, aquellos mutantes del canal Nav1.5 que no son capaces de alcanzar la membrana (p.R104W, p.D1690N, p.G1748D y p.D1816VfsX7) no fueron capaces de modular positivamente la  $I_{Kir2.1/2.2}$ . Más aún, algunos de estos mutantes como p.G1748D y p.D1816VfsX7 producían una disminución adicional de la  $I_{Kir2.1/2.2}$ . Es decir, estos mutantes del canal Nav1.5 producían un efecto dominante negativo (EDN) sobre los canales Kir2.1/2.2, lo que implica que el canal Nav1.5 mutado “atrapa” a los canales Kir2.1/2.2 nativos.

Estos mismos resultados se comprobaron en miocitos disociados de rata infectados con construcciones adenovirales que codificaban para el canal Nav1.5 WT o los mutantes. Tras 48 horas, se registraron tanto la  $I_{Na}$  como la  $I_{K1}$  con la técnica de patch-clamp en su configuración de célula entera. El mutante p.D1690N abolió la modulación recíproca positiva sobre  $I_{K1}$  disminuyendo su densidad, mientras que los mutantes p.D1816VfsX7 y p.G1748D produjeron una disminución adicional de la  $I_{K1}$  respecto a miocitos control sin infectar (EDN).

En el siguiente grupo de experimentos, seleccionamos el mutante p.G1748D para infectar hiPSC-CM, derivadas de fibroblastos cutáneos de donantes sanos. Tras la desdiferenciación y maduración de las células, se realizaron los experimentos de patch-clamp. Este mutante, produjo EDN sobre los canales Nav1.5 y Kir2.1 nativos lo que explicaba la reducción de la  $I_{K1}$ , la despolarización del potencial de reposo, el aumento de la frecuencia de disparo, y la prolongación de la DPA medida al final de la repolarización observado en hiPSC-CM.

Para identificar si ambos canales viajan conjuntamente a membrana, recurrimos a la técnica de *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) estudiando la cinética de recuperación de la fluorescencia de los fluoróforos mTq2 y Cp173Venus unidos a los canales Nav1.5 y Kir2.1, respectivamente, tras su extinción mediante láser en una región de interés. La fracción móvil de canales Nav1.5 aumenta cuando éstos se coexpresan con canales Kir2.1. En el caso de los canales Kir2.1 observamos que la cinética de recuperación de la

fluorescencia es significativamente más rápida cuando también están presentes los canales Nav1.5.

Posteriormente analizamos donde se quedaban retenidos los mutantes del canal Nav1.5 estudiados. Para ello, utilizamos varios mecanismos que rescatan mutantes retenidos en retículo endoplásmico (RE), como la disminución de la temperatura de incubación, la incubación con 4-fenilbutirato (una "chaperona" química) o con MOG1 (*Multicopy suppressor of gsp-1*). La densidad de  $I_{Nav1.5}$  generada por el mutante p.D1690N, pero no las generadas por los mutantes p.G1748D ni p.D1816VfsX7, aumentó con estos tratamientos, por tanto los resultados indicaban que el p.D1690N se queda retenido en RE mientras que p.G1748D y p.D1816VfsX7 en Golgi. Además, para correlacionar los efectos producidos por los mutantes y su lugar de retención utilizamos mutantes del canal Kir2.1 cuyo lugar de retención se conoce. Los resultados indicaron que el mutante de Kir2.1 retenido en RE (p.E377A-E379A) abolía la modulación positiva mientras que el retenido en Golgi (p.Δ314-315) producía EDN sobre el canal Nav1.5.

Por último, para caracterizar el mecanismo de tráfico conjunto de los canales Nav1.5-Kir2.1, incubamos durante 24 horas células CHO con BFA, que inhibe el tráfico anterógrado del RE al Golgi. La incubación con BFA no suprimió la modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y Kir2.1. Por tanto, los resultados indicaban que existe una ruta alternativa independiente del paso a través del Golgi que utilizan los complejos de canales Kir2.1-Nav1.5. Para estudiar esta posible ruta alternativa, silenciamos la proteína GRASP55, responsable del tráfico de ciertas proteínas, como los canales CFTR desde el RE hacia la membrana sin pasar por el Golgi. En estas condiciones, la cotransfección con canales Nav1.5 no moduló positivamente la densidad de  $I_{Kir2.1}$ , si no que la redujo un 63%. De la misma manera, la cotransfección con canales Kir2.1 tampoco aumentó la densidad  $I_{Nav1.5}$  si no que la redujo en un 61%, indicando que la inhibición de la ruta de tráfico no convencional GRASP-dependiente inhibe la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.1.

## CONCLUSIONES

1. Los canales Kir2.1 y Nav1.5 interaccionan entre sí y con la proteína de anclaje  $\alpha$ 1-sintrofina, en la membrana lateral y en las estriaciones de los miocitos ventriculares cardiacos.

2. Tanto los canales Nav1.5 como los canales Kir2.1 viajan hacia la membrana a través de dos rutas simultáneamente: la convencional, que implica el paso a través del RE, al Golgi, y desde allí a la membrana; y la no convencional, que es independiente de Golgi y está mediada por las proteínas GRASP.
3. En condiciones fisiológicas, la presencia simultánea de canales Nav1.5 y Kir2.1 en los miocitos cardiacos favorece la salida conjunta de ambos canales desde el RE a través de la ruta no convencional GRASP-dependiente.
4. Para que se produzca la modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y Kir2.1/2.2, y por tanto, entre la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  ventriculares, es condición *sine qua non* que tanto los canales Nav1.5 como los canales Kir2.1/2.2 sean capaces de alcanzar la membrana y viajen conjuntamente.
5. Cualquier mutación en los canales Nav1.5 que limite el tráfico de los mismos hacia la membrana, independientemente de su localización y naturaleza, impedirá que los canales Nav1.5 modulen positivamente la  $I_{K1}$  ventricular, por lo que la densidad de ésta disminuirá.
6. Los canales Nav1.5 con mutaciones que impiden su salida desde el RE hacia el Golgi pueden ser parcialmente “rescatados” por los canales Kir2.1/2.2 con los que, probablemente, abandonan el RE siguiendo la ruta de tráfico no convencional, GRASP-dependiente. Este mecanismo no restituye completamente, pero mitiga, la disminución de la  $I_{Na}$  producida por este tipo de mutaciones.
7. Los mutantes del canal Nav1.5 que queden retenidos en el Golgi producen un EDN sobre los canales Kir2.1/2.2 a los que atrapan también en el Golgi. Por tanto, los canales Nav1.5 con este tipo de mutaciones producen una disminución de la  $I_{K1}$  mayor que la producida por los mutantes Nav1.5 que quedan retenidos en el RE.
8. De todo lo anterior se puede concluir que en aquellos síndromes arritmogénicos primarios en los que las mutaciones en el gen *SCN5A* producen una disminución de la  $I_{Na}$  como consecuencia del incorrecto tráfico de los canales Nav1.5 a la membrana, la excitabilidad y la velocidad de conducción intracardiacas disminuirán por la inhibición concurrente de la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$ .



## **SUMMARY**



## FUNCTIONAL EFFECTS OF THE INTERACTION BETWEEN CARDIAC SODIUM CHANNEL Nav1.5 MUTANTS RESPONSIBLE FOR BRUGADA SYNDROME AND Kir2.x CHANNELS

### INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Brugada Syndrome (BrS) is a disorder characterized by an ECG pattern with incomplete right bundle-branch block and ST-segment elevations in the anterior precordial leads that predisposes to sudden death. BrS follows an autosomal dominant pattern of inheritance. Up to 30% of the positively genotyped patients harbor a mutation in the *SCN5A* gene, encoding for the  $\alpha$  subunit of the Nav1.5 cardiac channel, which, together with auxiliary subunits (Nav $\beta$ ), generates the fast inward Na current ( $I_{Na}$ ). These mutations encode for Nav1.5 channels that after their synthesis do not reach the membrane of cardiac myocytes and/or with gating defects. The result is that mutant channels either do not generate current or generate currents significantly smaller than those generated by WT channels (loss-of-function channels).

The  $I_{Na}$  is responsible for cardiac excitability and conduction velocity. Whereas, the inward rectifier current ( $I_{K1}$ ) is critical for setting the resting membrane potential, upon which depends the magnitude of the  $I_{Na}$ , and the duration of the action potential at the final phase of repolarization. Thus, the encompassed activity of  $I_{K1}$  and  $I_{Na}$  is the main determinant of cardiac excitability and it greatly determines refractoriness. Human cardiac  $I_{K1}$  is generated by homo- and/or heterotetramers of Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3 channels, which are distributed differentially between atria and ventricles. The Kir2.1 homotetramers generate the  $I_{K1}$  in human ventricles, while Kir2.2 and, especially, Kir2.3 channels are essential in the generation of the atrial  $I_{K1}$ . It has been recently demonstrated that expression of Nav1.5 and Kir2.1/2.2 channels is positively modulated. Indeed, expression of Nav1.5 increases the density of the currents generated by Kir2.1 ( $I_{Kir2.1}$ ) and Kir2.2 ( $I_{Kir2.2}$ ) channels and reciprocally. Furthermore, the presence of Kir2.3 channels in the tetramers that generate the  $I_{K1}$  suppresses the positive reciprocal modulation with Nav1.5 channels. In fact, at the human atria level there is no positive reciprocal modulation between  $I_{Na}$  and  $I_{K1}$ .

The question that arises now is what would occur with the expression of Kir2.1/2.2 channels, and thus with ventricular  $I_{K1}$ , in those patients that carry *SCN5A* mutations encoding



loss-of-function channels. Another question is whether Kir2.1/2.2 channels are able to restore the membrane expression of mutated Nav1.5 channels. Hence, it would be interesting to analyze the effects that Nav1.5 mutant channels associated with BrS have over the trafficking of Kir2.x channels and the  $I_{K1}$ , the membrane resting potential and the duration of action potential.

Therefore, the main objectives of this Doctoral Thesis were:

- 1) To identify if Nav1.5 and Kir2.1 channels interact with each other in heterologous expression system and in rat ventricular myocytes.
- 2) To analyze the effects of loss-of-function Nav1.5 mutants over the current density generated by Kir2.x channels and the  $I_{Na}$  in different cell models [heterologous expression system, rat ventricular myocytes and human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM)].
- 3) To analyze the effect of heterozygous targeted disruption of the *SCN5A* gene over the positive reciprocal modulation in transgenic mice.
- 4) To analyze the consequences of the presence of Nav1.5 loss-of-function channels on the characteristics of action potentials generated by cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC-CM).
- 5) To identify the biological mechanism responsible for the positive reciprocal modulation of Kir2.1 and Nav1.5 channels.

## RESULTS

As a first step, we used immunofluorescence to study the interaction between Kir2.1 and Nav1.5 channels in Chinese hamster ovary (CHO) cells and in ventricular myocytes isolated from adult rats. The results indicated that both channels colocalize in the lateral membrane and T-tubules of ventricular myocytes together with the scaffolding protein  $\alpha 1$ -syntrophin.

In isolated ventricular myocytes from *SCN5A*<sup>+/-</sup> transgenic mice, heterozygous targeted disruption of the *SCN5A* gene, encoding for Nav1.5 channels, produced a concomitant decrease of the ventricular  $I_{Na}$  and  $I_{K1}$ . Furthermore, it decreased the conduction velocity, shortened the action potential duration measured at 80% of repolarization, and depolarized the resting membrane potential.

Afterwards, we explored the consequences produced by the presence of Nav1.5 loss-of-function channels on the  $I_{K1}$  density and the positive reciprocal modulation in CHO cells, rat ventricular myocytes and hiPSC-CM. In all cases, coexpression of Kir2.1 WT and Nav1.5 WT channels lead to an increase in both  $I_{Na}$  and  $I_{K1}$  compared to the currents generated by the channels individually. Trafficking-defective Nav1.5 mutants that are expressed in the membrane (i.e. p.R878C or p.D1690N mutant together with p.H558R polymorphism) positively modulated the  $I_{Kir2.1/2.2}$ . Conversely, those Nav1.5 mutants that do not traffic towards the membrane (p.R104W, p.D1690N, p.G1748D, and p.D1816VfsX7) did not positively modulate the  $I_{Kir2.1/2.2}$ . Moreover, some trafficking-defective Nav1.5 mutants, such as p.G1748D and p.D1816VfsX7, produced an extra  $I_{Kir2.1/2.2}$  decrease. In other words, those Nav1.5 mutants produced a dominant negative effect (DNE) over Kir2.1/2.2 channels, implying that Nav1.5 mutants retain native Kir2.1/2.2 channels.

The same results were obtained in rat ventricular myocytes infected with adenoviral constructs, which encoded for Nav1.5 WT channels or Nav1.5 mutants. After 48 hours, both  $I_{Na}$  and  $I_{K1}$  were recorded using the whole-cell patch-clamp technique. The p.D1690N mutant abolished the reciprocal positive modulation over  $I_{K1}$  decreasing its density, while p.D1816VfsX7 and p.G1748D channels produced an additional  $I_{K1}$  decrease (DNE) relative to uninfected control myocytes. Hereafter the p.G1748D mutant was selected for further mechanistic analysis of the DNE over Kir2.1/2.2 channels.

In the next group of experiments, hiPSC-CM were obtained from skin fibroblasts of healthy donors after reprogramming and maturation of cells. Currents and AP were recorded with the patch-clamp technique in hiPSC-CM infected or not with adenoviral constructs containing either WT or p.G1748D Nav1.5 channels. The results demonstrated that p.G1748D produced a DNE over native Nav1.5 and Kir2.1 channels, which explained the  $I_{K1}$  decrease, together with a depolarization of the resting membrane potential, an increase of the spontaneous firing frequency and a prolongation of the duration of the action potential measured at the end of the repolarization observed in hiPSC-CM.

To identify if Nav1.5 and Kir2.1 channels reach the membrane jointly, we resorted to the *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) technique. We studied the kinetics of the fluorescence recovery of the fluorophores mTq2 and Cp173Venus joined to Nav1.5 and Kir2.1 channels, respectively, after their extinction with a laser in a region of interest. The mobile fraction of Nav1.5 channels increased in presence of Kir2.1 channels. Regarding

Kir2.1 channels, we observed a significantly faster fluorescence recovery with the coexpression of Nav1.5 channels. The results demonstrated that the FRAP kinetics and the mobile fraction of Nav1.5 and Kir2.1 channels in the presence of Kir2.1 and Nav1.5 channels respectively, was undistinguishable.

Subsequently we analyzed in which intracellular compartment the Nav1.5 mutants were retained. Some mechanisms are known to rescue trafficking-defective that are retained at the ER, such as incubation either at room temperature, with 4-phenylbutyrate (a chemical “chaperone”) or with the multicopy suppressor of *gsp-1* (MOG1). The  $I_{Nav1.5}$  density generated by p.D1690N, but not that generated by p.G1748D or p.D1816VfsX7, significantly increased with those treatments. Therefore, the results indicated that p.D1690N channels are retained at the ER, whereas p.G1748D and p.D1816VfsX7 are retained at the Golgi. Moreover, to correlate the effects produced by the mutants and their retention compartment, we used Kir2.1 channel mutants whose retention compartment is known. The results indicated that Kir2.1 mutant retained at ER (p.E377A-E379A) is not able to positively modulate the  $I_{Nav1.5}$  whereas the mutant retained at the Golgi (p.Δ314-315) produces a DNE over Nav1.5 channels.

Finally, in order to characterize the mechanism responsible of the joint trafficking of Nav1.5-Kir2.1 channels, we incubated CHO cells for 24 hours with BFA, which specifically inhibits the anterograde transport from ER to Golgi. The treatment with BFA did not abolish the positive reciprocal modulation between Nav1.5 and Kir2.1 channels. Thus, the results indicated that there is an alternative pathway independent from the Golgi that is used by Kir2.1-Nav1.5 channel complexes. To study this potential alternative pathway, we reduced the expression of GRASP55, which is involved in the traffic of some proteins, such as CFTR channels, from the ER to the membrane without going through the Golgi. In these conditions, cotransfection with Nav1.5 channels did not increase, but decreased  $I_{Kir2.1}$  density by 63%. Additionally, in GRASP silenced cells, cotransfection with Kir2.1 channels did not increase, but decreased the  $I_{Nav1.5}$  density by 61%. Therefore, GRASP silencing abolished positive modulation suggesting that GRASP-dependent unconventional traffic of Kir2.1 and Nav1.5 channels is involved in this process.

## CONCLUSIONS

1. Kir2.1 and Nav1.5 channels interact with each other and with the scaffolding protein  $\alpha 1$ -syntrophin both at the lateral membrane and in the striations of cardiac ventricular myocytes.
2. Both Nav1.5 and Kir2.1 channels reach the membrane through two simultaneous pathways: the classic anterograde, which involves the step from ER to Golgi and from there to the membrane; and the unconventional, which is independent from Golgi and mediated by GRASP proteins.
3. In physiological conditions, the simultaneous presence of Nav1.5 and Kir2.1 channels in cardiac myocytes favours their joint exit from the ER to the membrane through an unconventional pathway GRASP-dependent.
4. For the positive reciprocal modulation between Nav1.5 and Kir2.1/2.2 channels to occur, and hence, between ventricular  $I_{Na}$  and  $I_{K1}$ , it is a *sine qua non* condition the proper trafficking towards the membrane of both Nav1.5 and Kir2.1/2.2 channels.
5. Those Nav1.5 mutants that did not traffic towards the membrane, irrespective of the localization of the mutation and its nature, would prevent Nav1.5 channels to enhance ventricular  $I_{K1}$ , and consequently  $I_{K1}$  ventricular density will decrease.
6. Trafficking-defective Nav1.5 mutants that are retained at the ER, can be partially rescued by Kir2.1/2.2 channels, with which probably, leave the ER via an unconventional secretory route GRASP-dependent. This mechanism does not completely restore, although it mitigates, the  $I_{Na}$  decrease produced by said mutants.
7. Conversely, trafficking-defective Nav1.5 mutants that are retained at the Golgi produce a DNE over Kir2.1/2.2 channels, which are also trapped into the Golgi. Thus, Nav1.5 channels with such mutations would lead to a further  $I_{K1}$  decrease than that generated by those Nav1.5 mutants retained at ER.
8. In summary, we can conclude that in those primary arrhythmogenic syndromes in which mutations in *SCN5A* gene lead to an  $I_{Na}$  decrease as a consequence of a deficiency of Nav1.5 channels to reach the membrane, excitability and cardiac conduction velocity would decrease due to an  $I_{Na}$  and a  $I_{K1}$  concurrent decrease.

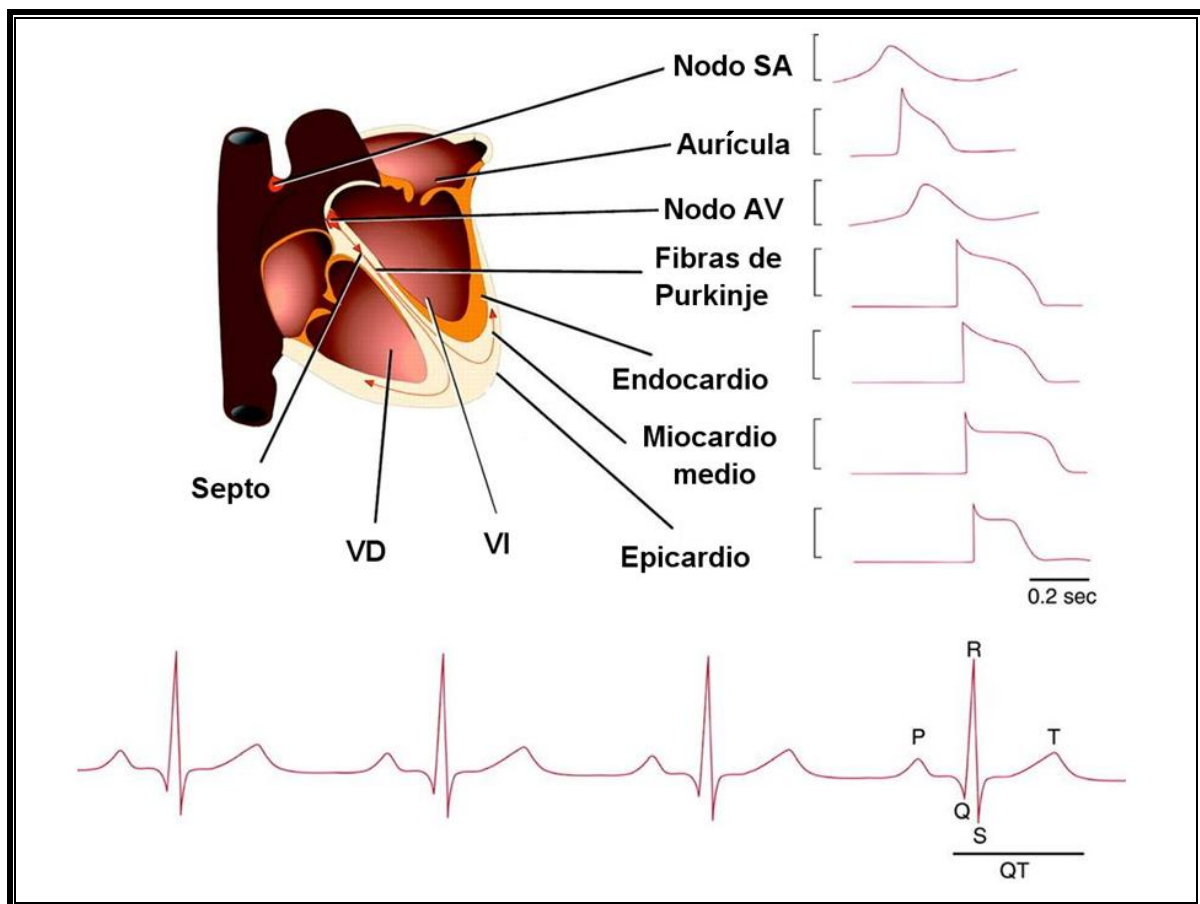


## **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDIACA

El corazón es un órgano que actúa a modo de bomba, enviando sangre a los distintos tejidos del organismo. Para llevar a cabo su función presenta tejidos especializados en los que se generan automáticamente impulsos que se conducen de forma organizada y provocan la contracción periódica del miocardio. El corazón está formado por tres tipos de tejido: los músculos auriculares y ventriculares, de los que depende su capacidad contráctil, y las fibras del tejido especializado de conducción, encargadas de la transmisión de los impulsos a través del corazón.



**Figura I.1. Representación esquemática de la actividad eléctrica en el miocardio.** Se observan los potenciales de acción registrados en diversas zonas del tejido cardiaco y su correlación con el electrocardiograma de superficie. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

En condiciones fisiológicas, el impulso cardiaco nace en el nodo senoauricular (SA), estructura que se localiza en la confluencia de la vena cava superior con la orejuela derecha y la pared lateral de la aurícula derecha (Figura I.1). El nodo SA genera unos 60-90 potenciales de acción (PA) por minuto que se propagan sin disminución de amplitud hasta que todas las células cardiacas son excitadas. Desde el nodo SA, el impulso se propaga por todo el tejido



auricular a una velocidad de 0.3 m/s para, a continuación, llegar al nodo aurículo-ventricular (AV), único punto que permite la comunicación eléctrica entre aurículas y ventrículos en condiciones fisiológicas. En el nodo AV, el estímulo se ralentiza antes de pasar al ventrículo (0.01-0.05 m/s). El impulso pasa después a las fibras de transición y al sistema de His-Purkinje, a través del cual se conduce muy rápidamente (2-4 m/s). El haz de His se bifurca en una rama derecha y varias izquierdas, que acaban ramificándose profusamente en fibras de Purkinje, desde donde la activación se extiende por el músculo ventricular, empezando por el septo medio izquierdo y la base de los músculos papilares y, de ahí, al resto de los ventrículos. La rápida velocidad de conducción intraventricular (0.3-4 m/s) tiene como misión permitir que ambos ventrículos se contraigan de forma sincrónica en un corto espacio de tiempo, algo esencial para que se realice de forma eficaz la función de bomba (Hoffman y Cranefield, 1960; Delpón y Tamargo, 2005).

Para comprender este complejo mecanismo, que se repite con cada latido, es necesario conocer algunas propiedades de las células cardíacas tales como la excitabilidad, el automatismo, la refractariedad y la conducción del impulso cardíaco.

### 1.1. Excitabilidad

La membrana citoplásmica es una barrera que separa dos medios acuosos de diferente composición. Pese a su diferente composición, tanto el medio intracelular como el extracelular han de cumplir el principio de neutralidad eléctrica (la suma de cargas positivas y negativas en el mismo medio debe ser cero) y de equilibrio osmótico (la presión osmótica debe ser idéntica a ambos lados de la membrana). Esta diferencia en la composición de ambos medios origina un gradiente de concentración que induce la difusión de moléculas desde el medio donde están más concentradas hacia el medio en el que lo están menos (Tabla I.1). Termodinámicamente, la difusión es un proceso que disminuye el orden del sistema (es decir, que aumenta su entropía), lo que implica que la difusión libera energía. Nernst cuantificó esta energía como una variación de potencial eléctrico:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.1)$$

donde  $\Delta G$  es la energía de Gibbs liberada en el proceso de difusión,  $R$  es la constante universal de los gases (8.31 J/mol·K),  $T$  es la temperatura absoluta y  $[ion]_e$  e  $[ion]_i$  son las

concentraciones extra e intracelulares del ion que difunde. En el caso de una membrana únicamente permeable al  $K^+$ , éste difundirá desde el interior (donde está más concentrado) hacia el exterior de la célula (donde está menos concentrado), por lo que en el interior se acumularán más cargas negativas, con lo que volverá a atraer iones  $K^+$  hacia el interior de la célula. La energía de atracción también puede cuantificarse:

$$\Delta G = -E \cdot z \cdot F \quad (I.2)$$

donde  $E$  es el potencial transmembrana,  $z$  es el número de oxidación del ion en cuestión y  $F$  es la constante de Faraday ( $9.65 \cdot 10^4$  C/mol). A medida que el  $K^+$  va saliendo de la célula, el gradiente eléctrico se iguala al gradiente químico (de concentración) que causa la difusión:

$$E \cdot z \cdot F = R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.3)$$

Reordenando los términos de la igualdad, se obtiene la “ecuación de Nernst” (Nernst, 1888):

$$E = (R \cdot T / z \cdot F) \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.4)$$

El potencial al cual el flujo neto a través de la membrana de un ion es nulo recibe el nombre de “potencial de equilibrio” (Tabla I.1) y su valor viene dado por la ecuación de Nernst.

Ion	[Ion] <sub>e</sub> (mM)	[Ion] <sub>i</sub> (mM)	Potencial de equilibrio
Na <sup>+</sup>	135-145	12	+67
K <sup>+</sup>	3.5-5	155	-96
Cl <sup>-</sup>	123	4.2	-90
Ca <sup>2+</sup>	1.5	10 <sup>-4</sup> nM	+129

**Tabla I.1. Concentraciones extra e intracelulares de los principales iones en condiciones fisiológicas.** Los potenciales de equilibrio para cada ion se han obtenido mediante la ecuación de Nernst para una temperatura de 37°C.

La diferencia de potencial que existe a ambos lados de la membrana se denomina potencial de membrana ( $E_m$ ) y viene determinado por la concentración de iones a uno y a otro lado de la misma, así como por la permeabilidad de la membrana a cada ion (Hoffman y Cranefield, 1960). Pero, además, algunas células como las nerviosas y las musculares son

excitables: son capaces de variar esta diferencia de potencial generando impulsos eléctricos (o PA) en respuesta a un estímulo mediante el intercambio de iones entre los medios intra y extracelular. En el miocardio, estos impulsos se propagan para convertirse en el factor determinante de la contracción rítmica del corazón. El control del intercambio iónico resulta además esencial para evitar una excesiva presión osmótica debida a los cambios en la osmolaridad de ambos medios.

#### 1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular

En condiciones de reposo, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  están más concentrados en el medio extracelular, mientras que el  $\text{K}^+$  y los aniones orgánicos (proteínas, ATP,...) son los que predominan en el medio intracelular. El transporte de iones a través de la membrana se produce a favor de gradiente de concentración (sin gasto de energía) o en contra de gradiente (y, por lo tanto, con gasto energético) y requiere de sistemas especializados de transporte como los canales iónicos o las proteínas transportadoras.

Los canales iónicos son proteínas transmembrana (TM) cuyas principales funciones son:

- Formar poros hidrófilos a través de los cuales los iones atraviesan la membrana a favor de gradiente de concentración y de potencial eléctrico (gradiente electroquímico), permitiendo el paso de iones masivamente (hasta  $10^8$  iones/s) y generando una corriente iónica.
- Discriminar los iones que pasan a su través, gracias a un filtro de selectividad. El mecanismo de selectividad se basa tanto en el tamaño del ion como en su carga, de modo que ciertos residuos del canal se alinean en el poro e interaccionan con los iones formando barreras termodinámicas que favorecen el paso de unos iones frente a otros.
- Controlar la permeabilidad de la membrana a cada ion mediante la transición entre los diferentes estados del canal. Entre los diferentes estados del canal se encuentran, al menos, un estado abierto y uno o más no conductores (estados cerrado e inactivo). Los cambios conformacionales de la proteína entre los distintos estados son lo que se denomina el *gating* del canal y se producen de forma muy rápida ( $<10 \mu\text{s}$ ). Según el estímulo que origine estos cambios conformacionales, los canales se clasifican en canales dependientes de voltaje (dependen del  $E_m$ ), canales activados por ligando (el proceso de apertura y cierre depende de la unión de factores externos como hormonas o neurotransmisores) y canales operados por segundos mensajeros (el *gating* está regulado por factores intracelulares como el  $\text{Ca}^{2+}$  o subunidades de proteínas G). En el caso de los canales dependientes de voltaje, la proteína

presenta una serie de aminoácidos que se encuentran cargados a pH fisiológico y que se mueven en un campo eléctrico muy limitado y confinado en la bicapa lipídica de la membrana celular, originando unas corrientes que se denominan corrientes de *gating* (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974).

Las proteínas transportadoras facilitan el movimiento de pequeñas moléculas a través de la membrana pero a una velocidad más lenta que la de los canales iónicos ( $10^2$ - $10^4$  moléculas/s). Dentro de este grupo se encuentran proteínas como las bombas iónicas o los cotransportadores.

### 1.1.2. El potencial de reposo

En condiciones normales, las células musculares auriculares y ventriculares y del sistema especializado de conducción presentan un  $E_m$  de aproximadamente -85 mV, mientras que en las células de los nodos SA y AV el  $E_m$  es de entre -45 y -65 mV. Las células de los nodos SA y AV y del tejido especializado de conducción presentan una propiedad conocida como “automatismo intrínseco”: son capaces de generar PA en ausencia de estímulos externos. Por el contrario, en las células musculares auriculares y ventriculares el valor del  $E_m$  se mantiene constante si la célula no es estimulada. A esta diferencia de potencial se le denomina “potencial de reposo” (PR) y está determinado por el equilibrio entre la capacidad de los distintos iones para atravesar la membrana a favor de su gradiente de concentración y el transporte activo de dichos iones en contra de su gradiente.

Si la membrana de las células cardiacas sólo fuera permeable al  $K^+$ , el  $E_m$  debería alcanzar un valor similar al del potencial de equilibrio para el  $K^+$  ( $E_K$ ). Sin embargo, el valor del  $E_m$  es menos negativo que el del  $E_K$  debido a que la membrana es además permeable a otros iones. Cuando una membrana es permeable a varios iones, el  $E_m$  depende de tres factores: la polaridad de la carga eléctrica de cada ion, la permeabilidad de la membrana ( $P$ ) a cada ion y la concentración de estos iones a ambos lados de la membrana. Por tanto, la ecuación que define el  $E_m$  en las células permeables al  $Na^+$ , al  $Cl^-$  y al  $K^+$ , denominada “ecuación de campo constante” o “ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz” (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949), es:

$$E_m = \left( \frac{RT}{Fz} \right) \ln \left[ \frac{([K^+]_e P_K + [Na^+]_e P_{Na} + [Cl^-]_e P_{Cl})}{([K^+]_i P_K + [Na^+]_i P_{Na} + [Cl^-]_i P_{Cl})} \right] \quad (I.5)$$

donde  $P_K$ ,  $P_{Na}$  y  $P_{Cl}$  representan la permeabilidad de la membrana al  $K^+$ , al  $Na^+$  y al  $Cl^-$ , respectivamente. En esta ecuación queda representado el equilibrio entre la difusión por gradiente de concentración y la atracción eléctrica de los elementos con carga, estando la contribución de cada ion ponderada en función de su permeabilidad, de modo que si una célula es muy permeable al  $K^+$ , el término  $P_K$  dominará el valor del  $E_m$ .

### 1.1.3. El potencial de acción (PA)

Hasta este momento se ha tratado la permeabilidad relativa de cada especie iónica como una constante. Sin embargo, no es así realmente. Un aumento rápido y transitorio de la permeabilidad al  $Na^+$  provocaría que el potencial de la membrana se hiciese más positivo (el  $E_m$  se acercaría al valor del  $E_{Na}$ , que es de aproximadamente +65 mV). Si a continuación aumentase de forma rápida y transitoria la permeabilidad al  $K^+$ , el potencial de membrana tendería al  $E_K$  (aproximadamente -96 mV), tal y como especifica la ecuación de Goldman. Los miocitos cardiacos, cuando reciben un estímulo de intensidad suficiente para superar el potencial umbral, generan un PA que es un estímulo “todo o nada”. La entrada de cargas positivas en la célula produce la despolarización, con lo que el interior de la célula va haciéndose más positivo (en su valor máximo, el potencial puede alcanzar valores cercanos a +40 mV), mientras que la salida de cargas positivas es responsable de la repolarización. Una vez finalizada la repolarización hay un breve periodo, denominado periodo refractario absoluto, en el que es imposible que un nuevo estímulo logre disparar un nuevo PA.

En el corazón se registran PA de diversas morfologías (Figura I.1). En las células musculares auriculares y ventriculares y en las células del sistema de His-Purkinje la despolarización es debida a la rápida entrada de iones de  $Na^+$ , mientras que en las células de los nodos SA y AV la despolarización es debida a la lenta entrada de iones de  $Ca^{2+}$ . Por lo tanto, en el corazón existen células que generan PA rápidos o “dependientes de  $Na^+$ ” y células que generan PA lentos o “dependientes de  $Ca^{2+}$ ” (Tabla I.2) (Coraboeuf y Otsuka, 1956; Beeler y Reuter, 1977; Carmeliet y Vereecke, 1979). Además, las diferentes fases del PA cardiaco se corresponden con las fases del electrocardiograma (ECG). Así, la despolarización del PA auricular se corresponde con la onda P. El intervalo PR refleja la velocidad de conducción a través del nodo AV, el complejo QRS, la despolarización y velocidad de conducción intraventriculares y el intervalo QT, la duración de la repolarización ventricular (Figura I.1). La duración del potencial de acción (DPA) es menor en las células auriculares

que en las ventriculares, lo que constituye un mecanismo de protección que evita que los ventrículos puedan responder a frecuencias auriculares muy altas o a una estimulación prematura del corazón. Además, también existen diferencias en la morfología y duración de los PA de diferentes zonas del tejido auricular y ventricular, lo que ha sido atribuido tanto a la expresión de distintos tipos de canales iónicos en dichas zonas como a la distribución heterogénea de la expresión de ciertos canales (Figura I.1).

#### *1.1.3.a. PA rápidos o dependientes de $\text{Na}^+$*

Los PA rápidos o dependientes de  $\text{Na}^+$  presentan 5 fases (Figura I.2) (Hoffman y Cranefield, 1960; Nattel, 2002; Delpón y Tamargo, 2005).

La fase 0 de rápida despolarización de las células miocárdicas se debe a la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje y, por lo tanto, a la activación de la corriente rápida de entrada de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ), que desplaza el potencial de membrana desde sus valores en reposo (PR  $\approx -85$  mV) hasta valores positivos ( $\approx +30$  mV). La activación de la  $I_{\text{Na}}$  es un proceso muy rápido (0.5-2 ms) y su inactivación sigue una cinética biexponencial, con un componente lento que se prolonga durante varios cientos de ms y que contribuye al mantenimiento de la fase 2 del PA. La magnitud de la  $I_{\text{Na}}$  determina la amplitud, la velocidad máxima de despolarización del PA y, por lo tanto, la velocidad de conducción intracardiaca (Hondegheem, 1978; Walton y Fozzard, 1979; Hille, 2001). A continuación, comienza la repolarización celular, en la que se distinguen 3 fases.

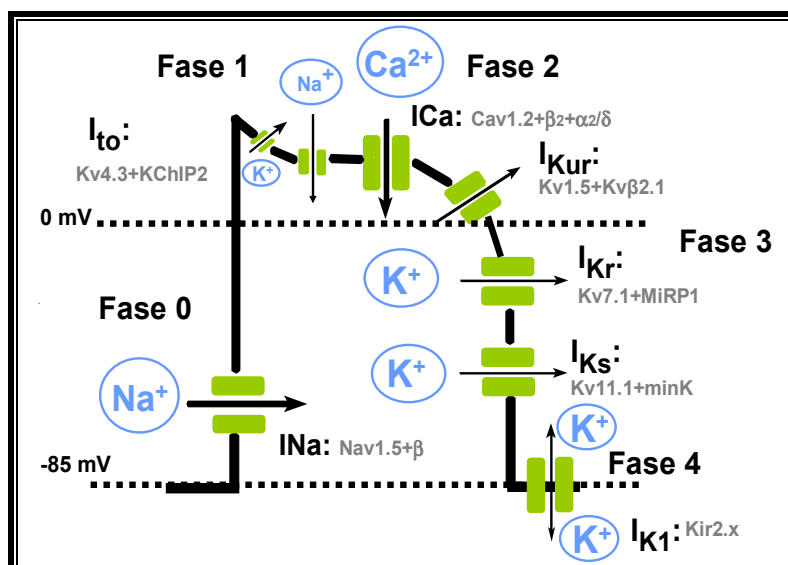
La fase 1 de rápida repolarización es consecuencia de la inactivación de la  $I_{\text{Na}}$  (paso del canal a una conformación no conductora) y de la activación de dos corrientes de salida de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje: la corriente transitoria ( $I_{\text{to1}}$ ), que se activa e inactiva rápidamente y que juega un papel fundamental en el control de la DPA sobre todo a nivel auricular y del epicardio ventricular (Boyett, 1981; Josephson y cols., 1984; Giles e Imaizumi, 1988; Shibata y cols., 1989) y el componente ultrarrápido de la corriente rectificadora tardía, de rápida activación y lenta inactivación ( $I_{\text{Kur}}$ ), que es específicamente auricular (Fedida y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993).

La fase 2 (o fase de meseta) representa el fino equilibrio entre dos corrientes de entrada, la  $I_{\text{Na}}$  (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Gintant y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985) y la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989; Bers y Pérez-Reyes, 1999), y tres corrientes rectificadoras tardías de salida de  $\text{K}^+$

dependientes de voltaje de activación ultrarrápida ( $I_{Kur}$ ), rápida ( $I_{Kr}$ ), y lenta ( $I_{Ks}$ ) respectivamente (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991; Wang y cols., 1993 y 1994).

Durante la fase 3, la inactivación de las corrientes de entrada provoca el predominio de las corrientes repolarizantes de  $K^+$  activadas durante la fase 2 y, como consecuencia, el  $E_m$  alcanza de nuevo el valor del PR. Además, durante la fase final de la repolarización se produce la salida de  $K^+$  a través de canales que presentan rectificación interna ( $I_{K1}$ ) (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001). En las células auriculares, el sistema His-Purkinje y en los nodos SA y AV, la acetilcolina (ACh) y la adenosina se unen a sus respectivos receptores (muscarínico  $M_2$  y de adenosina  $A_1$ , ambos acoplados a proteínas G inhibitorias) activando otra corriente que presenta rectificación interna, la corriente de  $K^+$  activada por acetilcolina ( $I_{K,ACh}$ ) (Sakmann y cols., 1983). La activación de la  $I_{K,ACh}$  hiperpolariza el  $E_m$  y acorta marcadamente la DPA (Shen y Kurachi, 1995; Pelleg y Belardinelli, 1993).

La fase 4 del PA se inicia una vez que el potencial de la célula alcanza de nuevo su valor de reposo y finaliza al comienzo del siguiente PA. En las células musculares auriculares y ventriculares que no son automáticas, esta fase es isoelectrónica (el  $E_m$  se mantiene constante) gracias principalmente a la  $I_{K1}$  (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2009). El valor del PR depende también de la actividad de la ATPasa dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  y la del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  que realizan intercambios electrogénicos y contribuyen a restaurar la homeostasis intracelular tras el PA.



**Figura I.2. PA auricular rápido o “dependiente de  $Na^+$ ”.** Representación esquemática de las distintas fases del PA, con las corrientes iónicas de entrada y salida implicadas en el mismo, así como las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que forman los canales que generan dichas corrientes.

### *1.1.3.b. PA lentos o dependientes de $\text{Ca}^{2+}$*

Los PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se generan en las células de los nodos SA y AV y en las células de los anillos de las válvulas mitral y tricúspide y en células anormalmente despolarizadas (PR de  $\approx -45$  mV) (Reuter, 1973; Cranefield y Aronson, 1975). A este potencial, la  $I_{\text{Na}}$  está totalmente inactivada, por lo que la fase 0 de los PA generados en estas células se debe a la lenta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular a través de la  $I_{\text{Ca,L}}$ .

## **1.2. Automatismo**

Aunque todas las células cardíacas son excitables y responden a los estímulos eléctricos generando PA, algunas, además, presentan actividad automática, es decir, son capaces de autoexcitarse y generar de forma espontánea PA. En condiciones fisiológicas, las células de los nodos SA y AV, de los tractos internodales auriculares y del sistema especializado de conducción His-Purkinje presentan actividad automática, careciendo de ella las fibras musculares auriculares y ventriculares (Hoffman y Cranefield, 1960). Los PA generados en estas estructuras presentan una fase 4 de lenta despolarización diastólica que desplaza el nivel del  $E_m$  hasta el nivel de potencial umbral y cuando éste se alcanza, se genera un nuevo PA propagado. La frecuencia de disparo de una célula automática depende del potencial diastólico máximo, del nivel de potencial umbral y de la pendiente de la fase 4 de lenta despolarización diastólica.

En condiciones fisiológicas, las células del nodo SA generan PA a mayor frecuencia que las restantes células automáticas (60-80 latidos/min frente a  $\approx 15$  latidos/min), por lo que actúan como marcapasos dominante y determinan la frecuencia cardíaca, mientras que las demás células automáticas actúan como “marcapasos latentes o subsidiarios”.

## **1.3. Refractariedad**

Desde hace más de 150 años se sabe que el corazón requiere cierto tiempo para recuperar la excitabilidad tras un primer estímulo, tiempo que se conoce como “periodo refractario” (Bowditch, 1871).

En las células que generan PA dependientes de  $\text{Na}^+$ , este periodo refractario viene determinado por la cinética de reactivación de la  $I_{\text{Na}}$ . Los canales de  $\text{Na}^+$  permanecen en



estado de reposo durante la diástole (fase 4), se abren durante la fase 0 del PA y, a continuación, pasan a un estado inactivo no conductor (que no permite la entrada de  $\text{Na}^+$ ) en el que permanecen hasta que la repolarización alcanza valores más negativos de -50 mV. Durante el “periodo refractario absoluto”, la célula es incapaz de generar un PA y permanece inexcitable (Weidmann, 1955a; Hoffman y Cranefield, 1960; Hondeghem y Katzung, 1977). Conforme el potencial de membrana de la célula se repolariza entre -50 y -90 mV, cierta proporción de los canales de  $\text{Na}^+$  pasan del estado inactivo al estado de reposo y, por lo tanto, la aplicación de un estímulo eléctrico es capaz de generar una respuesta. Esta respuesta tendrá menor amplitud y se conducirá tanto más lentamente cuanto menor sea el tiempo transcurrido entre la aplicación del estímulo y el comienzo de la fase 0 del PA previo. En este periodo, llamado “periodo refractario efectivo”, un estímulo supraumbral puede producir una respuesta local, pero no un PA propagado (Hoffman y Cranefield, 1960). Le sigue otro periodo de tiempo durante el cual un estímulo es capaz de inducir la génesis de un PA propagado, denominado “periodo refractario relativo”. A este nivel, la  $I_{\text{Na}}$  todavía no se ha reactivado por completo, por lo que si se genera un PA prematuro, tendrá menor amplitud y menor duración que un PA generado cuando la célula se ha repolarizado y recuperado por completo su excitabilidad. Estos PA prematuros se propagan más lentamente, es decir, presentan un bajo factor de seguridad de la conducción, y el bloqueo de la misma propicia la aparición de arritmias por reentrada (Hoffman y Cranefield, 1960). La duración del periodo refractario cardiaco determina la máxima frecuencia de estimulación cardiaca y varía con la DPA. Las células auriculares presentan una menor duración del PA y del periodo refractario que las ventriculares ( $\approx 200$  ms en las primeras frente a los  $\approx 300$  ms de las segundas), lo que explica por qué la frecuencia de las arritmias supraventriculares es mayor que la de las ventriculares. El periodo refractario, además, protege al corazón de aquellas situaciones en las que la frecuencia es muy rápida, y en las que, por tanto, se impide la relajación completa del músculo cardiaco y disminuyen su función de bomba.

#### **1.4. Propagación del impulso cardiaco**

La propagación del impulso cardiaco es un fenómeno complejo que depende no sólo del tipo, tamaño, orientación y geometría de las células cardiacas, sino también de las propiedades activas y pasivas de la membrana. Las propiedades activas están determinadas por los mecanismos iónicos dependientes de voltaje y de tiempo responsables de la génesis

del PA. Por otro lado, la conducción del impulso cardiaco dependerá también de los factores que determinan el PR, el acoplamiento intercelular y las propiedades de cable de la membrana (resistencia y capacitancia), esto es, de las propiedades pasivas de la membrana.

Biofísicamente, la membrana es un elemento dieléctrico que aísla dos medios conductores. Sin embargo, este aislamiento no es perfecto, ya que existen mecanismos de transporte de iones, por lo que la resistencia al paso de cargas que ofrece la membrana ante una diferencia de potencial es finita y medible. Además, el dieléctrico (en este caso, los fosfolípidos de la membrana) que aísla los medios extra e intracelular está sometido a una diferencia de potencial en la membrana, por lo que atrae cargas a las proximidades de la membrana (los aniones del citosol serán atraídos por el exterior positivo y los cationes del medio extracelular son atraídos por el interior negativo). En estas condiciones, la membrana está acumulando carga según la ecuación:

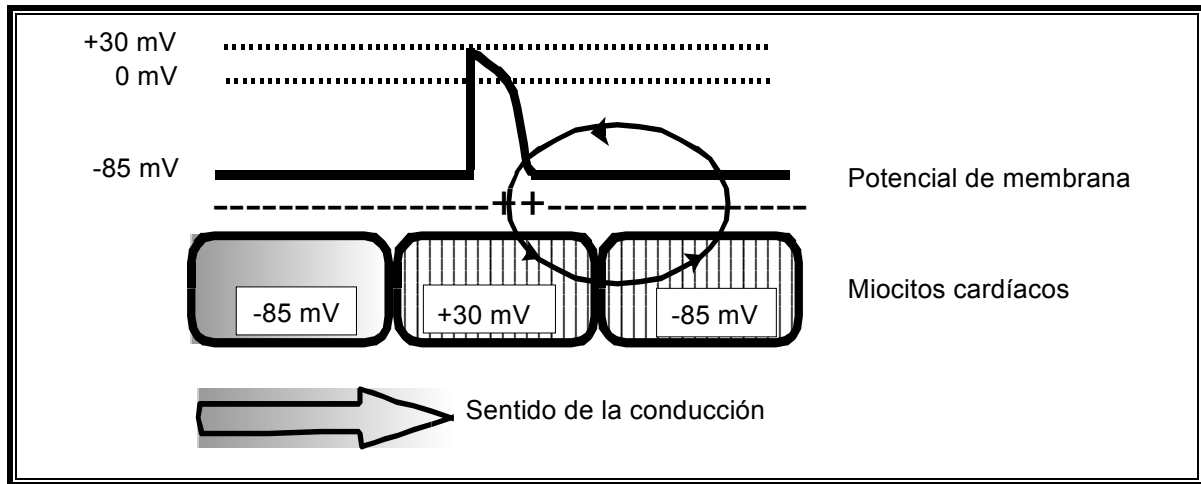
$$Q = E_m \cdot C_m \quad (\text{I.6})$$

donde  $Q$  es la carga acumulada y  $C_m$  la capacitancia de la membrana, que depende de las propiedades dieléctricas de la bicapa lipídica y de la geometría de la membrana. La  $C_m$  impone un retraso en la variación del voltaje y en la propagación del estímulo, ya que cualquier variación en el  $E_m$  debe vencer primero la carga acumulada en la membrana.

Los miocitos cardiacos están unidos entre sí por los discos intercalares, que permiten el acoplamiento eléctrico, y por los desmosomas, uniones especializadas que facilitan el acoplamiento contráctil. Estas uniones permiten que el miocardio funcione como un sincitio funcional. Este acoplamiento se realiza a través de uniones de baja resistencia ( $1\text{-}3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , unas 700 veces menor que la de la resistencia externa de la membrana), a las que se denomina “uniones estrechas” (*gap junctions*). En condiciones fisiológicas, la resistencia intracelular es mínima para un acoplamiento célula-célula que facilite la propagación sincrónica.

El impulso cardiaco se genera en el nodo SA y se propaga de forma electrotónica a las células excitables vecinas, desplazando su nivel de  $E_m$  hasta el nivel de potencial de membrana de la célula vecina ya excitada. Cuando esto sucede, se genera un nuevo PA, que a su vez despolarizará electrotónicamente las células vecinas y así sucesivamente (Figura I.3). Cuanto mayor sea la amplitud de la  $I_{Na}$  que genera el PA, mayor será la velocidad de conducción con que éste se conducirá por el miocardio y, por lo tanto, mayor será el margen de seguridad de propagación del impulso cardiaco. Por el contrario, en todas aquellas situaciones en las que la

$I_{Na}$  esté parcialmente inhibida o en aquellas células que generen PA dependientes de  $Ca^{2+}$  el margen de seguridad de propagación del impulso será menor (Delpón y Tamargo, 2005).



**Figura I.3** Representación esquemática de la propagación del impulso cardíaco.

Una vez que los impulsos salen del nodo SA, se propagan con rapidez a toda la aurícula, produciendo la sístole auricular. A su paso a través del nodo AV, la propagación se ralentiza, lo que permite que la contracción auricular impulse la sangre hacia los ventrículos, optimizando el gasto cardíaco y reduciendo la posibilidad de que queden remanentes sanguíneos en la aurícula. Una vez atravesado el nodo AV los impulsos entran en el sistema de conducción, donde la propagación es más rápida, permitiendo finalmente la contracción ventricular coordinada.

## 2. CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE IMPLICADOS EN EL PA CARDIACO HUMANO

### 2.1. Canales de $\text{Na}^+$

Los canales de sodio dependientes de voltaje, son esenciales para el inicio (despolarización) y la propagación del PA en tejidos excitables (ver apartado I.4 para una descripción más amplia).

### 2.2. Canales de $\text{Ca}^{2+}$

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la despolarización de la membrana y son esenciales para acoplar las señales eléctricas en la superficie celular con la respuesta fisiológica a nivel celular (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989). Inicialmente, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje se clasificaron según la magnitud de la despolarización requerida para su activación: los que requerían una fuerte despolarización (HVA, *High Voltage Activated* o *Long-lasting*) y los que requerían una despolarización menor (LVA, *Low Voltage Activated*). Los canales LVA son los que hoy en día se conocen como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T, que se activan rápidamente a  $E_m \approx -50$  mV y se inactivan también rápidamente (Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Los canales HVA se abren cuando se despolariza la membrana hasta  $\approx -30$  mV y su inactivación puede prolongarse hasta 100 milisegundos. Hasta el momento, se han identificado 5 subtipos de canales HVA (L, N, P, Q y R) que presentan diferentes propiedades cinéticas, biofísicas y farmacológicas. Sin embargo, en el miocardio humano sólo se ha demostrado la presencia de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

Los canales tipo L presentes en los miocitos cardiacos determinan la fase de meseta del PA. Se localizan principalmente en los túbulos T, desde donde promueven la apertura de los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico (RyR2), con la consiguiente salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el mismo (lo que se denomina “liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ”). Por su parte, los canales tipo T se localizan principalmente en las células auriculares y en las células automáticas del nodo SA y de las fibras de Purkinje, mientras que su presencia en las células ventriculares es mínima (Mitra y Morad, 1986; Yuan y cols., 1986; Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989). Debido a este patrón de expresión, se ha propuesto que los canales tipo T

pueden participar en la regulación del automatismo cardíaco (Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Wu y Lipsius, 1990).

### 2.2.1. Estructura de los canales de $\text{Ca}^{2+}$

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje son heterotetrámeros compuestos por las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ , y, en algunos tejidos, la subunidad  $\gamma$  (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005; Rougier y Abriel, 2016). Hasta ahora, se han identificado los genes que codifican la expresión de 10 subunidades  $\alpha_1$ , 4 subunidades  $\beta$ , 4 complejos  $\alpha_2/\delta$  y 8 subunidades  $\gamma$ , aunque, a nivel cardíaco, sólo se ha demostrado la existencia de las subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ . Los diferentes tipos de corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) se definen en función de la subunidad  $\alpha_1$  que forma el canal, mientras que las subunidades reguladoras modulan su tráfico a membrana y/o las propiedades biofísicas de la corriente (Figura I.4) (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005; Rougier y Abriel, 2016).

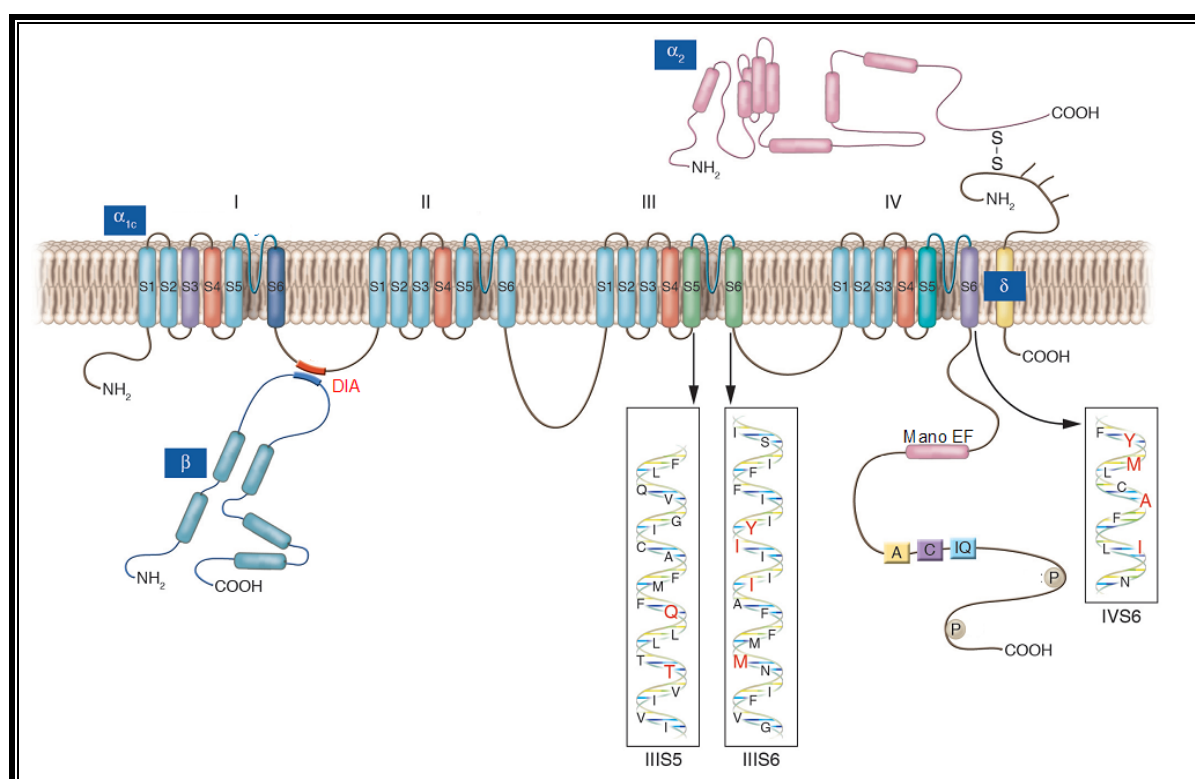


Figura I.4. Estructura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. [Adaptada de Bodi y cols., 2005]

- Subunidad  $\alpha$

La familia Cav1 codifica las subunidades  $\alpha_1$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, siendo la Cav1.2 ( $\alpha_{1C}$ ) la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005; Zamponi y cols., 2015; Rougier y Abriel, 2016). Se han identificado tres variantes de la isoforma Cav1.2 (Cav1.2a-c), de las que la Cav1.2a es la isoforma específicamente cardíaca.

Por su parte, la familia Cav3 codifica las subunidades  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1G}$  y  $\alpha_{1H}$ ) de los canales tipo T (Pérez-Reyes, 2003). Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentan una gran homología estructural con los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje. Las subunidades  $\alpha_1$  presentan 4 dominios homólogos (DI a DIV), cada uno compuesto por 6 segmentos TM en  $\alpha$ -hélice (S1 a S6) (Figura I.4). El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  presenta 4 cargas positivas en los S4 de cada dominio, dando lugar al sensor de voltaje. Estos residuos cargados están altamente conservados en todas las familias de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . También como en los canales de  $\text{Na}^+$ , el lazo P que une los S5 y S6 de los cuatro dominios se hunde en la membrana y contribuye a formar el poro del canal. Cada uno de los lazos P del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  contiene un residuo de glutámico (“locus EEEE”). Estos residuos forman una zona de alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  (similar al locus DEKA de los canales de  $\text{Na}^+$ ) y forman el filtro de selectividad del canal (Mikala y cols., 1993; Klockner y cols., 1996; Koch y cols., 2000).

- Subunidades reguladoras

Las subunidades  $\beta$  son proteínas citosólicas que se ensamblan con las subunidades  $\alpha_1$  mediante un dominio de interacción  $\beta$  (DIB) que se une al dominio de interacción  $\alpha$  (DIA) de la subunidad  $\alpha_1$  (Figura I.4) (De Waard y cols., 1994; Pragnell y cols. 1994). Estas subunidades regulan la expresión en la membrana de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  HVA (Bichet y cols., 2000). Además, modulan las propiedades biofísicas del canal e intervienen en la regulación por el pH (Schuhmann y cols., 1997) o por receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Mikala y cols., 1998). Además, se ha descrito que las subunidades  $\beta$  podrían intervenir en el proceso de “facilitación” de la  $I_{\text{Ca,L}}$  o aumento de la amplitud de la corriente al aumentar la frecuencia de estimulación (Cens y cols., 1996). La subunidad  $\beta$  predominante en el miocardio humano es la Cav $\beta$ 2b codificada por el gen *CACNB2b* (Buraei y Yang, 2010).

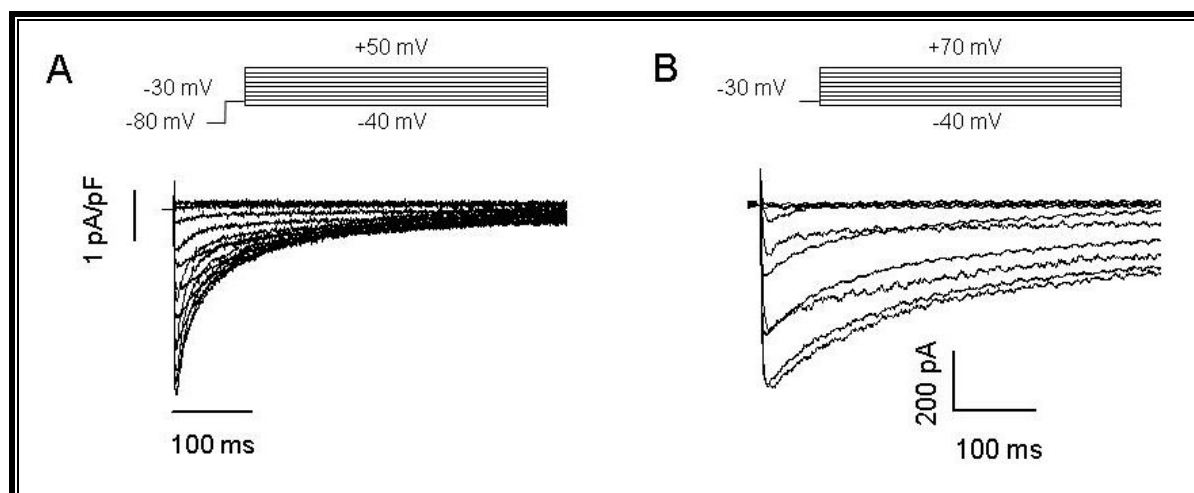
- Subunidad  $\alpha_2/\delta$

El complejo  $\alpha_2/\delta$  está formado por la unión mediante un puente disulfuro de la subunidad extracelular  $\alpha_2$  y la subunidad TM  $\delta$  (Figura I.4). La función del complejo  $\alpha_2/\delta$  varía según las

subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$  con las que interacciona, aunque se ha sugerido que el dominio  $\delta$  interviene en los cambios cinéticos mientras que el dominio  $\alpha_2$  es responsable del aumento de la expresión del canal en la membrana (Hofmann y cols., 1994; Mori y cols. 1996). De todas las isoformas, la que se considera predominante en el miocardio humano es la  $\alpha_2\delta_1$  codificada por el gen *CACNA2D1* (Burashnikov y cols., 2010).

### 2.2.2. Características de la $I_{Ca,L}$

La  $I_{Ca,L}$  registrada en miocitos cardiacos presenta un potencial umbral de activación de alrededor de -30 mV y alcanza su máxima amplitud entre 0 y +10 mV. La activación y la inactivación son relativamente lentas, alcanzándose el pico máximo al cabo de 1-5 milisegundos (Figura I.5A). La inactivación de la corriente es un proceso dependiente del voltaje y de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y cols., 1985; Zhang y cols., 1994). En la inactivación dependiente de voltaje, el lazo DI-DII actúa como partícula bloqueante del canal (Kim y cols., 2004a). La inactivación debida a altas  $[Ca^{2+}]_i$  representa un mecanismo de retroalimentación negativo de gran importancia (Brehm y Eckert, 1978) en el que están implicados un motivo de unión a calmodulina (CaM) (el “motivo IQ”), un motivo en “mano EF” y los péptidos A y C que se encuentran en el extremo C-terminal del canal (Figura I.4) (Zuhlke y cols., 1999; Peterson y cols., 2000). Así, tras la despolarización y la entrada de  $Ca^{2+}$ , la  $[Ca^{2+}]_i$  aumenta hasta el rango micromolar, lo que hace que el  $Ca^{2+}$  se una a la CaM asociada al canal y se promueva la inactivación y por tanto el cese de la entrada de  $Ca^{2+}$  al miocito cardiaco. Los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L son también permeables al  $Ba^{2+}$ . De tal forma que cuando se utiliza  $Ba^{2+}$  como ión conductor en lugar de  $Ca^{2+}$ , se suprime la inactivación dependiente del aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y por tanto la disminución de la corriente es menor y con una cinética más lenta (Figura I.5.B).



**Figura 1.5. Características de la corriente generada por los canales de calcio tipo L.** (A)  $I_{Ca,L}$  registrada en nuestro laboratorio en miocitos auriculares humanos tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. [Adaptada de Pérez-Hernández y cols., 2016]. (B) Corriente de Bario generada por los canales de Calcio tipo L registrada en nuestro laboratorio en células HL-1 tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior [Adaptada de Barana y cols., 2014]

El canal de  $Ca^{2+}$  tipo L es una diana farmacológica muy importante para el tratamiento de diversas patologías. Dada la ubicuidad del  $Ca^{2+}$  como mensajero intracelular, los fármacos que inhiben la  $I_{Ca,L}$  (denominados “antagonistas del  $Ca^{2+}$ ”) están indicados en el tratamiento de la angina de pecho, hipertensión arterial (HTA), vasculopatías periféricas, algunas taquiarritmias supraventriculares y como protectores renales y cardiacos. Los antagonistas del  $Ca^{2+}$  se dividen estructuralmente en 3 grupos: las 1,4-dihidropiridinas (DHP, como el nifedipino), las bencilalquilaminas (como el verapamilo) y las benzotiazepinas (como el diltiazem). Todos ellos tienen su sitio de unión en el dominio formador del poro de la subunidad  $\alpha$  (Tikhonov y Zhorov, 2008 y 2009; Cheng y cols., 2009).

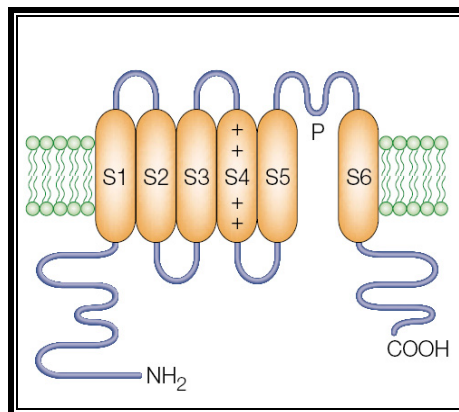
### 2.3. Canales de $K^+$ voltaje-dependientes

Los canales de  $K^+$  constituyen el grupo más heterogéneo de proteínas de membrana. Se distribuyen ubicuamente a lo largo de toda la escala filogenética y están presentes prácticamente en todas las células, donde juegan un importante papel, por ejemplo, en el mantenimiento del PR celular, la frecuencia de disparo de las células automáticas, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales o la regulación de la contracción del músculo liso esquelético y cardíaco.



A nivel cardiaco, los canales de  $K^+$  juegan un papel fundamental en el PA, ya que permiten la salida de  $K^+$  de la célula, lo que conduce a la repolarización celular. Las cinéticas de activación e inactivación de cada canal determinan su participación en el control de la excitabilidad celular: los canales que se activan rápidamente intervienen en la repolarización durante las primeras fases del PA, mientras que los canales que generan corrientes rectificadoras tardías que se activan lentamente participan fundamentalmente en la repolarización durante la fase 3. Los canales de  $K^+$  presentan una distribución heterogénea en función del tejido (aurícula frente a ventrículo) e incluso dentro de un mismo tejido (endocardio frente a epicardio). La heterogeneidad en los tipos y en la distribución de los canales de  $K^+$  determina la diferencia en la morfología de los PA de las distintas regiones del corazón (Figura I.1). Además, la expresión y las propiedades de los canales de  $K^+$  también pueden verse modificadas por fármacos, hormonas y diferentes enfermedades o patologías.

Los principales canales de  $K^+$  voltaje-dependientes que existen en el miocardio son aquellos canales formados por 6 segmentos TM y 1 poro (6TM/1P) (Figura I.6). En este grupo se incluyen los clásicos canales de  $K^+$  voltaje-dependientes cardiacos y también los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$ , que presentan un segmento TM adicional (S0) en el extremo N-terminal.



**Figura I.6. Topología de la subunidad  $\alpha$  de los canales de  $K^+$  voltaje-dependientes presentes en el miocardio pertenecientes al grupo de canales formados por 6 segmentos TM y 1 poro (6TM/1P).** [Adaptadas de Choe, 2002]

### 2.3.1. Canales 6TM/1P

Los canales 6TM/1P agrupan a los canales de  $K^+$  activados por voltaje (canales  $K_v$ ) y a los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  (canales  $K_{Ca}$ ).

Tras el clonaje del primer canal de K<sup>+</sup> identificado en el mutante *Shaker* de la mosca del vinagre (Jan y cols., 1983; Papazian y cols., 1987) se identificaron otras tres subfamilias de genes que codifican la expresión de un gran número de canales Kv a las que se denominó *Shab*, *Shaw* y *Shal*. En mamíferos, estas cuatro familias se corresponden con las familias Kv1 (*Shaker*), Kv2 (*Shab*), Kv3 (*Shaw*) y Kv4 (*Shal*). Hasta la fecha, se han descrito doce familias de subunidades  $\alpha$  Kv (Kv1 a Kv12), con una homología aminoacídica de  $\approx 70\%$  dentro de una misma familia y de  $\approx 40\%$  entre diferentes familias (Gutman y cols., 2005). Además, la diversidad funcional de los canales Kv se ve aumentada por factores como: a) la formación de heterotetrámeros (Christie y cols., 1990; Ruppersberg y cols., 1990; Covarrubias y cols., 1991; MacKinnon, 1991); b) la presencia de miembros de las familias Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9, que no forman canales funcionales por sí solos sino que son subunidades moduladoras que se ensamblan con subunidades Kv2 formando heterotetrámeros (Gutman y cols., 2005); c) la presencia de proteínas auxiliares, que modifican la función y/o la expresión en la membrana de los canales Kv (Gutman y cols., 2005); d) modificaciones postranscripcionales (*splicing* alternativo), que dan lugar a diferentes isoformas de los canales a partir de la expresión de un mismo gen (London y cols., 1997); y e) modificaciones postraduccionales, que regulan la función de muchos canales Kv mediante fosforilación, ubiquitinización, palmitoilización, nitrosilación, etc. (Grandi y cols., 2016; Chiamvimonvat y cols., 2016).

### 2.3.1.a. Estructura de los canales Kv

Los canales Kv están formados por cuatro subunidades  $\alpha$  y un número variable de subunidades auxiliares.

#### I. La subunidad $\alpha$

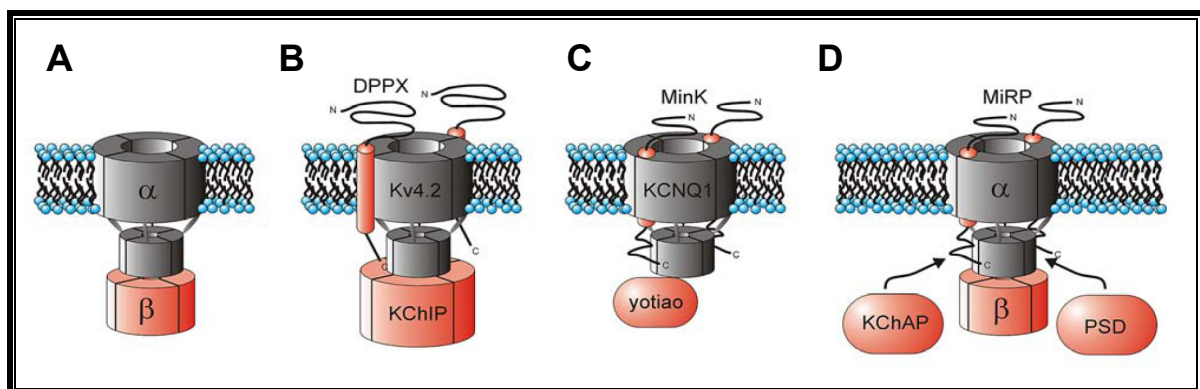
En los canales Kv, cada subunidad  $\alpha$  consta de 6 segmentos TM (S1 a S6) con estructura de hélice  $\alpha$  y conectados entre sí por secuencias hidrofílicas no conservadas (Figuras I.6A). La secuencia que conecta el S5 y el S6 se denomina región P, está formada por 20 aminoácidos, y se introduce en la membrana (1 nm) tapizando la parte extracelular del poro iónico (Liman y cols., 1991; MacKinnon, 1991; Yellen y cols., 1991; Yool y Schwarz, 1991; Whicher y cols., 2016). El poro iónico es el sitio de unión de muchas toxinas (Doyle y cols., 1998; Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y cols., 2001; Jiang y cols., 2002), del tetraetilamonio (TEA)

(Yellen y cols., 1991; Choi y cols., 1993) y de diferentes fármacos antiarrítmicos (Yeola y cols., 1996) y anestésicos locales (Valenzuela y cols., 1995; Franqueza y cols., 1997; Caballero y cols., 2002).

Los canales Kv son capaces de detectar los cambios de voltaje producidos en la membrana y acoplar esta señal a su funcionamiento (Armstrong, 1974; Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000 y 2002). Esta dependencia del  $E_m$  se debe a la presencia en su estructura de un “sensor de voltaje” formado por los segmentos S1 a S4 del canal. En concreto, la secuencia de cada S4 contiene cuatro o más residuos cargados positivamente (argininas y lisinas) que se recolocan en la membrana cuando el  $E_m$  varía (Liman y cols., 1991; Papazian y cols., 1991), produciendo un movimiento de cargas a través del campo eléctrico TM que se puede medir experimentalmente ( $\approx 12-13 e_0$ ) (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995) y que se denomina “corriente de *gating*” (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974)

## II. Subunidades auxiliares

El ensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  es suficiente para formar un canal funcional que genere una corriente iónica. Sin embargo, la presencia de subunidades auxiliares aumenta la diversidad funcional de los canales Kv (Figura I.7) y regula funciones como el *gating* y la expresión y/o el transporte a la membrana celular de los canales. Además, estas subunidades pueden servir como sitio de unión de moléculas adaptadoras o de ligandos exógenos/endógenos.



**Figura I.7. Dibujo esquemático de diversos tipos de subunidades auxiliares de canales iónicos y su posición respecto al poro.** Las subunidades  $\alpha$  aparecen en gris y las subunidades  $\beta$  en rojo. (A) Ensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  Kv a través del extremo N-terminal con 4 subunidades Kv $\beta$  citosólicas. (B) Interacción del canal Kv4.2 con un complejo de 4 subunidades citoplásmicas KChIP. Se observa también la asociación de la subunidad DPPX con la subunidad  $\alpha$ . (C) Asociación de 4 subunidades Kv7.1 con 2 subunidades minK, así como la formación del complejo macromolecular con la proteína adaptadora yotiao. (D) Complejo molecular formado por una subunidad  $\alpha$  Kv, las subunidades auxiliares Kv $\beta$ , MiRP y KChAP y una proteína de densidad pos-sináptica (PSD). [Adaptadas de McCrossan y Abbott, 2004]

- Subunidades Kv $\beta$

La familia de las subunidades Kv $\beta$  está compuesta por tres proteínas homólogas (Kv $\beta$ 1 a Kv $\beta$ 3), así como varias isoformas de alguna de ellas (Wang y cols., 1996; Martens y cols., 1999). Son proteínas citosólicas que se ensamblan a la subunidad  $\alpha$  por el extremo N-terminal y su principal efecto es inducir una rápida inactivación de la corriente (especialmente las Kv $\beta$ 1), aunque también se ha descrito una función tipo chaperona que podría promover o estabilizar la expresión de los canales en la membrana (Figuras I.7A y D) (Nakahira y cols., 1996; Martens y cols., 1999; Wissmann y cols., 1999).

- Subunidad minK y péptidos relacionados

Hasta la fecha se han descrito 5 proteínas codificadas por genes de la familia KCNE (KCNE1 a KCNE5). Todas ellas presentan un único segmento TM, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

La proteína minK (*minimal K<sup>+</sup> channel subunit*) fue la primera en ser identificada (Takumi y cols., 1988; Murai y cols., 1989). Las siguientes subunidades auxiliares codificadas por genes KCNE se identificaron por homología con minK y se denominaron MiRP (*MinK-Related Peptides*) (Figura I.7D) (Abbott y cols., 1999; McCrossan y Abbott, 2004).

- Subunidad KChAP

La subunidad KChAP (*K<sup>+</sup> Channel-Associated Protein*) pertenece a la familia de proteínas inhibidoras del STAT activado (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Wible y cols., 1998). Estas proteínas interactúan con una gran variedad de factores de transcripción e intervienen en procesos como la apoptosis (Wible y cols., 2002). La subunidad KChAP es una proteína citoplásmica que puede unirse al extremo N-terminal de las subunidades  $\alpha$  Kv1, Kv2 y Kv4 (Figura I.7D) (Wible y cols., 1998; Kuryshev y cols., 2000).

- Subunidades KChIP

Las subunidades auxiliares KChIP (*Kv Channel Interacting Protein*) son proteínas citosólicas de las que se han identificado cuatro tipos (KChIP1 a KChIP4) y diversas isoformas de varias de ellas. Estas subunidades se unen al extremo N-terminal de las

subunidades  $\alpha$  con una estequiometría 1:1 (Figura I.7B) (Kim y cols., 2004b). La mayoría de las proteínas KChIP modifican la actividad del canal afectando a la cinética de inactivación y/o de recuperación de la inactivación (An y cols., 2000; Decher y cols., 2001; Patel y cols., 2002; Wang y cols., 2007).

- Subunidades DPPX

Las proteínas dipeptidilpeptidasas (DPP) pertenecen a la familia de serina-proteasas no clásicas y son glicoproteínas de membrana con un largo extremo C-terminal extracelular (Wada y cols., 1992). El primer miembro identificado de esta familia fue la proteína DPP6 (Figura I.7B), del que se ha sugerido que tiene como función regular la cinética y el tráfico a la membrana de los canales Kv4 (Kin y cols., 2001; Nadal y cols., 2003; Radicke y cols., 2008), con los que interacciona siguiendo una estequiometría 1:1 (Soh y Goldstein, 2008).

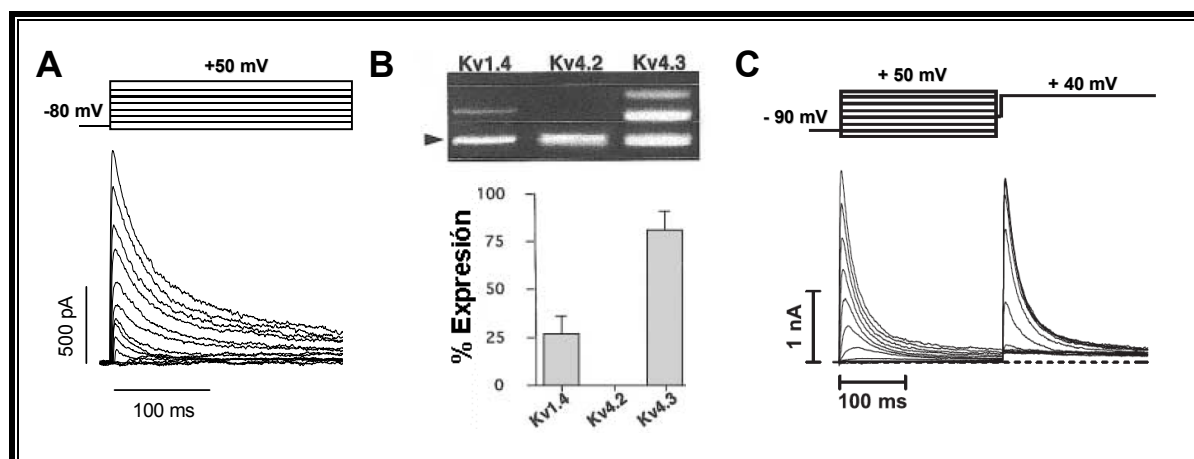
### 2.3.1.b. Principales corrientes generadas a través de canales Kv que intervienen en el PA cardiaco

Gracias a estudios realizados con la técnica de *patch-clamp* en miocitos auriculares y ventriculares, se han podido identificar las corrientes de  $K^+$  generadas a través de canales Kv implicadas en el PA cardiaco, que son: la  $I_{to1}$ , la  $I_{Kur}$ , la  $I_{Kr}$  y la  $I_{Ks}$ .

#### I. La $I_{to1}$

La corriente transitoria está formada en realidad por dos componentes bien diferenciados, la  $I_{to1}$  y la  $I_{to2}$ , donde sólo la  $I_{to1}$  es una corriente de  $K^+$ , ya que la  $I_{to2}$  es una corriente de  $Cl^-$  activada por  $Ca^{2+}$  (Siegelbaum y cols., 1977; Kenyon y Gibbons, 1979; Coraboeuf y Carmeliet, 1982; Hiraoka y Kawano, 1989). A su vez, existen dos fenotipos de  $I_{to1}$ : una  $I_{to1}$  lenta ( $I_{to1,s}$ ) y una  $I_{to1}$  rápida ( $I_{to1,f}$ ). Ambos fenotipos se pueden distinguir en función de sus propiedades biofísicas, moleculares y farmacológicas (Nerbonne y Kass, 2005; Chiamvimonvat y cols., 2016). En cualquier caso la  $I_{to1}$  es responsable de la rápida repolarización del PA durante la fase 1, por lo que determina la altura y la duración de la fase de meseta (Nerbonne, 2000; Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004; Niwa y Nerbonne, 2010).

La  $I_{to1}$  se activa (alcanza su máxima amplitud en 5-20 milisegundos) e inactiva rápidamente (Figura I.8), siendo su reactivación también muy rápida ( $\approx 50$  milisegundos) (Litovsky y Antzelevitch, 1988; Fermini y cols., 1992). La amplitud de la  $I_{to1}$  es dependiente de la frecuencia cardíaca, por lo que su papel en la DPA es más importante a frecuencias cardíacas lentas.



**Figura I.8. Características de la  $I_{to1}$ .** (A)  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Detección por PCR de los distintos tipos de canales que generan la  $I_{to1}$  auricular humana (panel superior) y representación de la expresión relativa de su ARN mensajero (ARNm) (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda de control interno. (C) Corriente generada por canales Kv4.3 registrada en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. [Adaptadas de Gómez y cols., 2008 (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Caballero y cols., 2004 (C)]

En el miocardio humano (Escande y cols., 1987; Beuckelmann y cols., 1993; Näbauer y cols., 1993; Varro y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993), la densidad de la  $I_{to1}$  es  $\approx 6$  veces mayor en el tejido auricular y en las fibras de Purkinje que en el ventrículo, mientras que dentro de éste, la  $I_{to1}$  presenta un gradiente transmural de expresión (epicardio > células M > endocardio, siendo  $\approx 3-4$  veces mayor en el epicardio que en el endocardio) (Wettwer y cols., 1994; Näbauer y cols. 1996; Li y cols., 1998). Además, se observa un patrón de expresión para los dos fenotipos de la  $I_{to1}$  según la región del miocardio que se estudia: la  $I_{to1,s}$  se expresa fundamentalmente en regiones que presentan una DPA más prolongada (endocardio, ventrículo izquierdo, septo y ápex), mientras que la  $I_{to1,f}$  se expresa mayoritariamente en regiones epicárdicas, ventrículo derecho y en la base del corazón (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004; Niwa y Nerbonne, 2010).

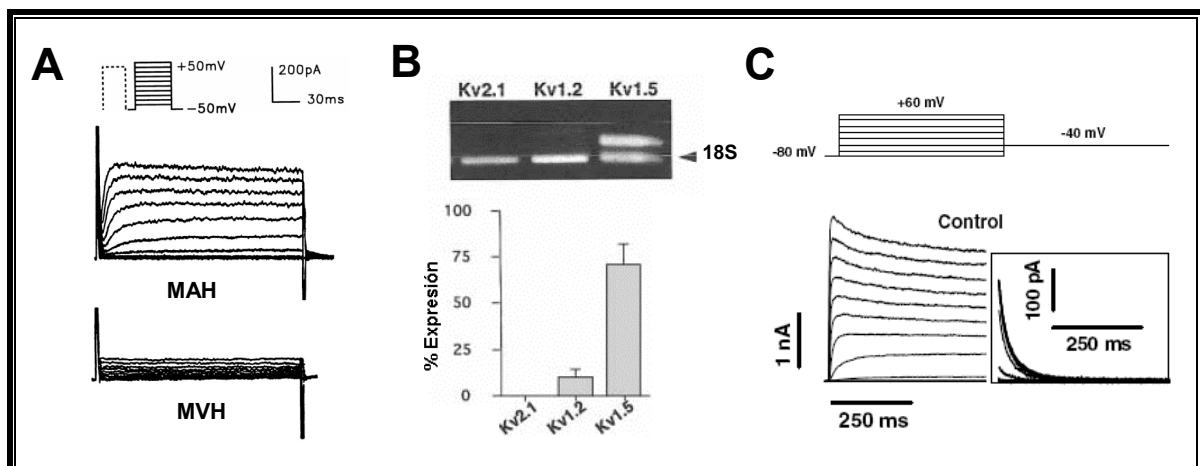
Se ha propuesto que los canales que generan la  $I_{to1,s}$  están formados por tetrámeros de subunidades Kv1.4 (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004; Niwa y Nerbonne, 2010) posiblemente asociadas a subunidades Kv $\beta$ 1 y/o Kv $\beta$ 2 (Morales y cols., 1995; Serodio y cols.,

1996). Por el contrario los canales que generan en el miocardio humano la  $I_{to1,f}$  están formados por subunidades Kv4.3 (Dixon y cols., 1996; Kong y cols., 1998; Dilks y cols., 1999). En este caso diversas subunidades auxiliares parecen formar parte del canalosoma que genera la  $I_{to1,f}$  incluyendo las subunidades KChIP2 (Bähring y cols., 2001; Kuo y cols., 2001; Rosati y cols., 2001), MiRP1 y MiRP2 (Zhang y cols., 2001; Deschênes y Tomaselli, 2002; Lundby y Olesen, 2006; Radicke y cols., 2006; Delpón y cols., 2008) y DPP6 (Radicke S y cols., 2008).

## *II. La $I_{Kur}$*

Las células auriculares humanas, pero no las ventriculares (Figura I.9A) (Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b), presentan una corriente de salida de  $K^+$  denominada  $I_{Kur}$  que se activa en el rango de potenciales de la fase de meseta del PA (Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Amos y cols., 1996; Feng y cols., 1998a). Su exclusiva presencia auricular contribuye a que la DPA en este tejido sea más breve que en el ventricular (Feng y cols., 1998b; Tamargo y cols., 2009) y la convierte en una posible diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de arritmias auriculares (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002; Tamargo y cols., 2009).

La  $I_{Kur}$  se activa rápidamente (<10 milisegundos) y su inactivación, dada la lentitud del proceso, se considera mínima en condiciones fisiológicas (Figura I.9) (Apkon y Nerbonne, 1991; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b; Tamargo y cols., 2004; Caballero y cols., 2010b). Sin embargo, la recuperación de la inactivación también es muy lenta, lo que tiene gran importancia para explicar la dependencia de frecuencia de esta corriente a potenciales de membrana fisiológicos (Feng y cols., 1998a y 1998b).



**Figura I.9. Características de la  $I_{Kur}$ .** (A)  $I_{Kur}$  registrada en miocitos auriculares humanos (MAH) tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Tras aplicar el mismo protocolo en miocitos ventriculares humanos (MVH), la  $I_{Kur}$  no aparece. (B) Detección por PCR de canales Kv que generan corrientes tipo  $I_{Kur}$  en muestras auriculares humanas (panel superior) y representación de la expresión relativa del ARNm de cada uno (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda del control interno. (C) Corriente generada por canales Kv1.5 humanos expresados en células *Ltk* tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. [Adaptadas de Li y cols., 1996b (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Gómez y cols., 2005 (C)]

La  $I_{Kur}$  humana es generada por tetrámeros de subunidades Kv1.5 asociados a subunidades Kv $\beta$ 1 (Nattel y cols., 1999). Curiosamente la proteína Kv1.5 se expresa en igual proporción en aurícula y en ventrículo humano, aunque sólo genera canales funcionales en la aurícula (Fedida y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b).

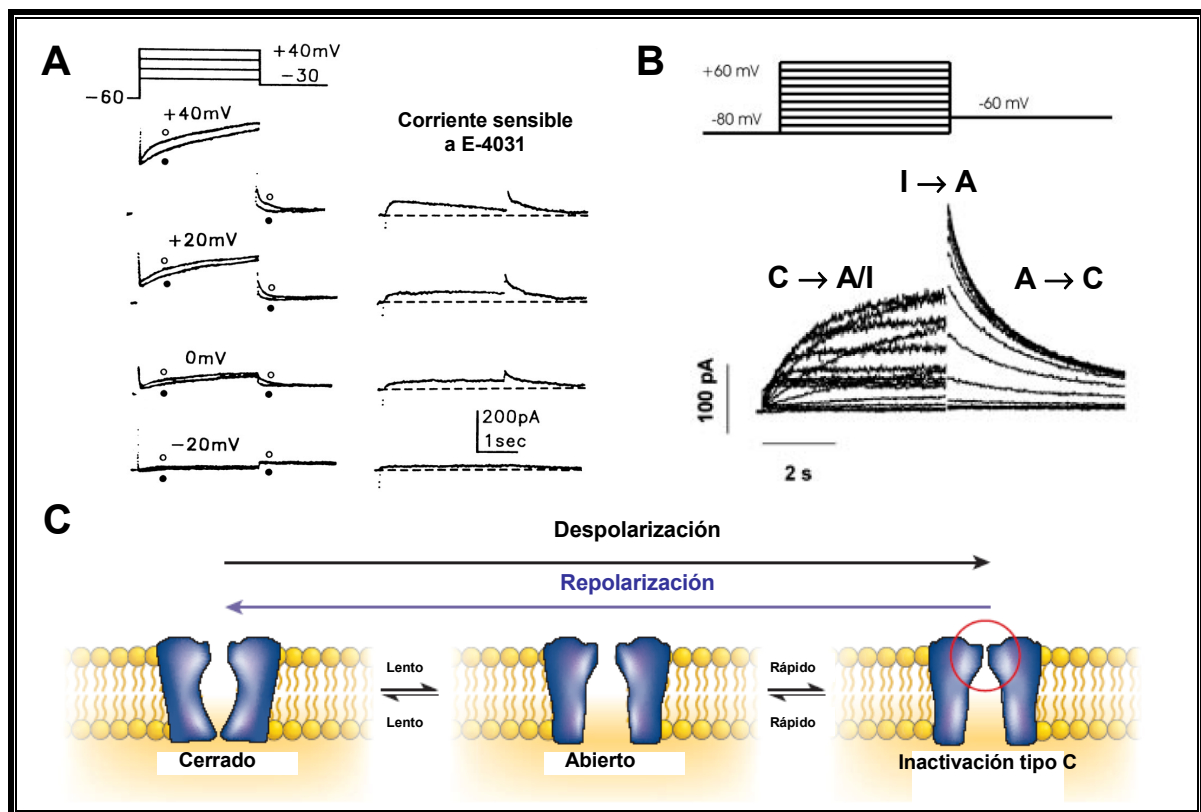
### III. La $I_{Kr}$

El componente rápido de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía contribuye a la fase 3 de la repolarización y juega un importante papel en el control de la DPA y del periodo refractario (Hancox y cols., 1998; Zhou y cols., 1998; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004). La importancia de la  $I_{Kr}$  se ha puesto de manifiesto gracias a diferentes patologías en las que se producen mutaciones tanto en la subunidad  $\alpha$  (Sanguinetti y cols., 1995 y 1996a) como en las subunidades  $\beta$  (Abbott y cols., 1999), que se pueden manifestar como el Síndrome de QT largo (SQTL) congénitos o adquiridos (Splawski y cols., 2000; Tamargo, 2000) y que se han relacionado con un aumento del riesgo de sufrir arritmias. Además, la  $I_{Kr}$  es la diana terapéutica de los antiarrítmicos de clase III (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Spector y cols., 1996a; Nattel y Singh, 1999).



### *III.a. Características de la $I_{Kr}$*

Con la despolarización del  $E_m$ , la amplitud de la  $I_{Kr}$  va aumentando progresivamente hasta alcanzar un máximo a potenciales entre 0 y +10 mV. A potenciales más positivos, la amplitud disminuye debido a que la inactivación del canal tiene lugar más rápidamente que la activación (Figura I.10) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Li y cols., 1996a; Spector y cols., 1996b; Smith y cols., 1996; Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001; Caballero y cols., 2003; Amorós y cols., 2011; Caballero y cols., 2017). Sin embargo, cuando la repolarización alcanza valores de  $E_m$  negativos (en la fase 3 del PA), los canales que generan la  $I_{Kr}$  se recuperan rápidamente de la inactivación y vuelven a entrar en el estado abierto (la velocidad de recuperación de la inactivación a través del estado abierto es más rápida que la de deactivación), lo que da lugar a una corriente de gran tamaño que facilita la repolarización final del PA (Figura I.10) (Hancox y cols., 1998; Zhou y cols., 1998; Tseng, 2001). Por todo ello, el grado de activación de la  $I_{Kr}$  durante la fase 2 viene determinado por la dependencia de voltaje y de tiempo de la activación de los canales, mientras que en la fase 3 su participación está determinada por la recuperación de la inactivación y la deactivación de los mismos (Tseng, 2001). Tanto las características biofísicas como la distribución de los canales que generan la  $I_{Kr}$  son específicas de cada especie. Así, la densidad de la  $I_{Kr}$  en el miocardio humano es mayor en el ventrículo que en la aurícula, mientras que en la rata y el cobayo ocurre lo contrario (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1991; Pond y cols., 2000; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004).



**Figura I.10. Características de la  $I_{Kr}$ .** (A) Corriente registrada en miocitos ventriculares humanos en ausencia (○) y en presencia (●) de E-4031 tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior (a la izquierda) y componente sensible al E-4031 (la  $I_{Kr}$ , a la derecha). (B) Registro de la corriente generada por subunidades Kv11.1 registrada en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Se muestran las transiciones entre las diferentes conformaciones del canal (A: Activo. C: Cerrado. I: Inactivo). (C) Representación esquemática de los distintos estados del canal Kv11.1. [Adaptadas de Li y cols., 1996a (A), Caballero y cols., 2003 (B) y Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006 (C)]

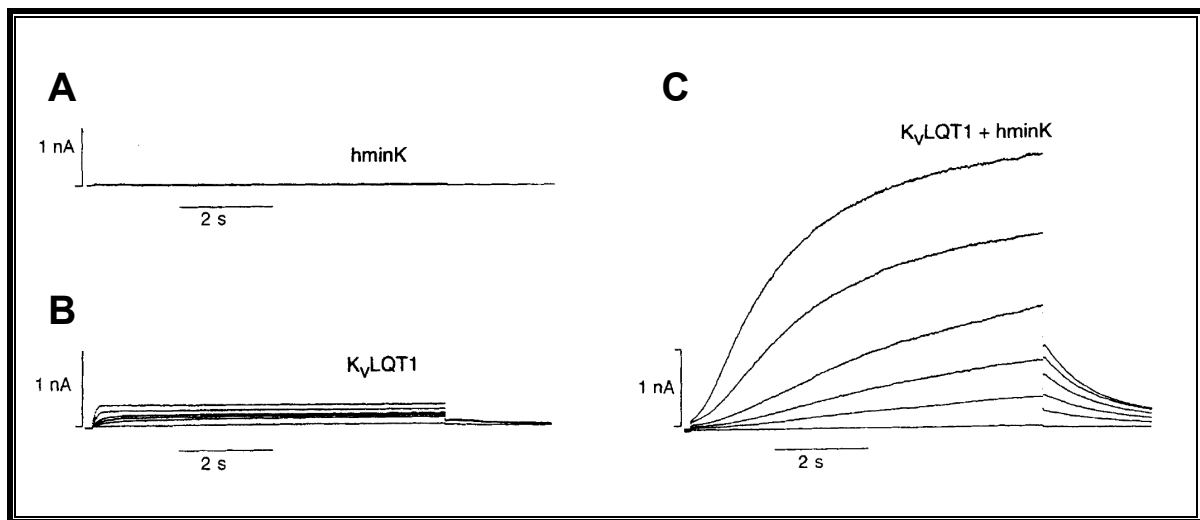
### III.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kr}$

La  $I_{Kr}$  es generada por tetrámeros de la subunidad  $\alpha$  Kv11.1 (antiguamente denominada hERG, *human ether-à-go-go related gene*) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991) de la cual existen, al menos, dos isoformas debidas a modificaciones postranscripcionales en su extremo N-terminal (hERG1a y hERG1b) con diferentes propiedades biofísicas (London y cols., 1997; Wang y cols., 2000). Se acepta que ambas isoformas se ensamblan en el miocardio para formar un canal heterotetramérico (Jones y cols., 2004). Existen datos experimentales que sugieren que las subunidades minK (codificada por *KCNE1*) y, principalmente, MiRP1 (*KCNE2*) forman parte de los canales que generan la  $I_{Kr}$ , sin embargo, la estequiometría de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y su posible distribución tejido-específica en el miocardio humano no ha sido identificada todavía. Algunos autores sugieren que MiRP1 se expresa exclusivamente en las fibras de Purkinje y en las células marcapaso (Pourrier y cols., 2003; Nawathe y cols.,

2013), y no en las células auriculares o ventriculares, lo que pone en duda el papel de esta subunidad en la formación de los canales que generan la  $I_{Kr}$ .

#### IV. La $I_{Ks}$

El componente lento de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía participa fundamentalmente en la fase 3 de los PA auriculares y ventriculares (Delpón y cols., 1995; Jespersen y cols., 2005; Tamargo y cols., 2004; Caballero y cols., 2010). La importancia de la  $I_{Ks}$  en la repolarización se pone de manifiesto porque las mutaciones en los genes que codifican los canales que generan esta corriente están relacionadas con la aparición de diversos síndromes arritmogénicos (SQTL-, Síndrome de QT corto –SQTC-, fibrilación auricular –FA-).



**Figura I.11. Características de la  $I_{Ks}$ .** (A-C) Corrientes registradas en células de mamífero transfectadas sólo con las subunidades minK (A) y Kv7.1 (B) o con ambas subunidades a la vez (C). [Adaptadas de Sanguinetti y cols., 1996b]

##### IV.a. Características de la $I_{Ks}$

La  $I_{Ks}$  se activa a potenciales más positivos de -30 mV, alcanza la mitad de su activación máxima a +20 mV y presenta una amplitud hasta 10 veces mayor que la de la  $I_{Kr}$  cuando su activación es máxima (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Kurokawa y cols., 2001). La cinética de activación de la  $I_{Ks}$  es muy lenta y su amplitud máxima en estado estable sólo se alcanza con despolarizaciones extremadamente largas (Mitcheson y Sanguinetti, 1999), mientras que su cinética de deactivación es muy lenta y dependiente de voltaje (Virag y cols., 2001). La  $I_{Ks}$

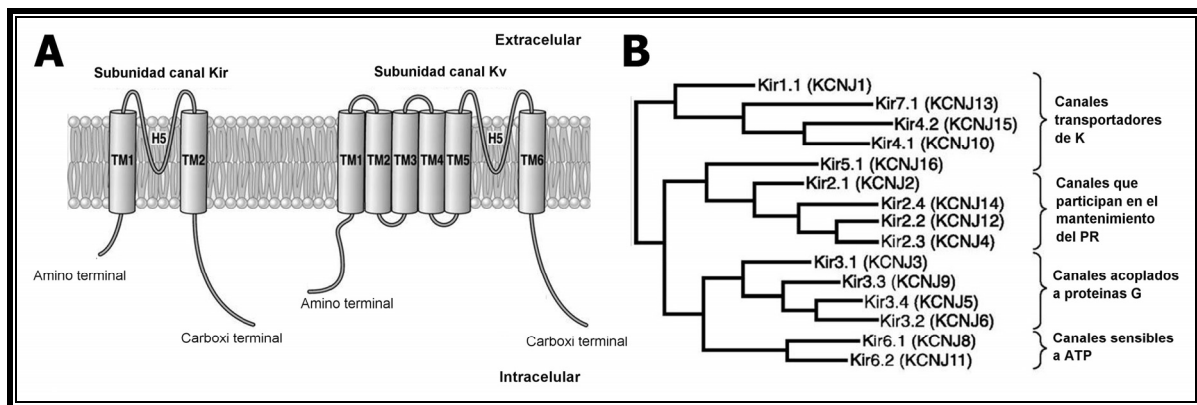
es la principal responsable del control de la DPA ventricular a frecuencias rápidas, ya que, al aumentar la frecuencia cardíaca, los canales que generan la  $I_{Ks}$  tienen menos tiempo para desactivarse y se acumulan en el estado abierto, propiciando una repolarización más rápida y el acortamiento de la DPA (Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993; Delpón y cols., 1995).

#### *IV.b. Composición de los canales que generan la $I_{Ks}$*

Cuatro subunidades  $\alpha$  Kv7.1 (antiguamente denominada KvLQT1) se ensamblan a través del dominio C-terminal con dos subunidades auxiliares minK para generar una corriente que se activa lentamente y cuyas características se corresponden con la  $I_{Ks}$  nativa (Figura I.11C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b; Chen y cols., 2003a; Schmitt y cols., 2000). Sin embargo cada una de las subunidades por separado no genera corrientes similares a las registradas en las células nativas (Figura I.11C).

### 3. CANALES QUE GENERAN CORRIENTES CON RECTIFICACIÓN INTERNA

Los canales de  $K^+$  rectificadores internos (Kir) presentan una estructura 2TM/1P, es decir, están formados por la asociación de 4 subunidades  $\alpha$ , que constan únicamente dos segmentos TM que se encuentran tapizando el poro iónico. Estos canales desempeñan varias funciones importantes como el control de la señalización neuronal, el PR y la frecuencia cardiaca o la liberación de insulina. Desde un punto de vista evolutivo, los canales 2TM/1P son los más antiguos y su estructura recuerda a los S5 y S6 de los canales Kv (Figura I.12A). Sin embargo, los canales Kir carecen de un dominio sensor de voltaje equivalente al de los canales Kv (S1 a S4), lo que concuerda con los estudios electrofisiológicos que demuestran que la conductancia de los canales Kir depende de la diferencia entre el  $E_m$  y el  $E_K$ , y no sólo del  $E_m$ .



**Figura I.12. Estructura básica y árbol filogenético de los canales Kir.** (A) Estructura primaria de una subunidad de canales Kir (*izquierda*). Cada subunidad Kir contiene dos regiones TM (TM1 y TM2), un loop formador del poro (H5), y un  $NH_2$  y  $COOH$  terminal citosólico. Para permitir la comparación se muestra a la *derecha* la estructura de una subunidad de canales Kv (B) Análisis filogenético y de la secuencia de aminoácidos de 15 subunidades conocidas de canales Kir humanos. Estas subunidades pueden ser clasificadas en 4 grupos funcionales [Adaptadas de Hibino y cols., 2010]

#### 3.1. Una familia de canales de $K^+$ con rectificación interna

En 1949, Bernard Katz (Katz, 1949) identificó la presencia en las fibras de músculo esquelético una nueva corriente de  $K^+$  cuya amplitud aumentaba a potenciales más negativos del  $E_K$  y disminuía con potenciales despolarizantes.

En los años siguientes, se demostró la presencia de corrientes con características similares (“rectificadoras internas” ver más adelante) en el músculo cardiaco de diferentes especies (Weidmann, 1955; Hutter y Noble, 1960; Rougier y cols., 1968; Mascher y Peper, 1969; Beeler y Reuter, 1970) y se describieron las principales características de esta rectificación

interna. Pero no fue hasta los años 90, con el auge de las técnicas de biología molecular, cuando se consiguieron clonar los primeros canales que generaban este tipo de corrientes (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y 1993b) y describir los mecanismos moleculares de la rectificación interna (Fakler y cols., 1994; Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994; Fakler y cols., 1995).

Tras el clonaje de los primeros canales Kir (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y 1993b), se han identificado muchas más proteínas pertenecientes a esta familia de canales. Además, se ha unificado la nomenclatura de los genes que codifican las proteínas que forman los canales Kir, que han sido nombrados como KCNJ. Actualmente, la familia de canales Kir se compone de 7 subfamilias (Kir1 a Kir7) (Tabla I.2), con distintas propiedades, diferente distribución y más o menos bien definidas funciones fisiológicas para cada una de ellas (Kubo y cols., 2005). Las proteínas Kir presentan entre 327 y 501 aminoácidos y una homología estructural de entre un 30 y un 40%, mientras que dentro de cada subfamilia el grado de homología llega a alcanzar el 60%.

Familia	Corriente	Proteína	Gen	Cromosoma	Localización
<b>Kir1 (ROMK)</b>		Kir1.1-1.3	KCNJ1	17q25	Riñón, corazón, páncreas
<b>Kir2 (IRK)</b>	$I_{K1}$	Kir2.1	KCNJ2	17q23.1-24.2	Corazón, SNC, ME, ML, pulmón, placenta, riñón
	$I_{K1}$	Kir2.2	KCNJ12	17p11.1	Corazón
	$I_{K1}$	Kir2.3	KCNJ4	22q13.10	Corazón, SNC, ME
		Kir2.4	KCNJ14	19q13.1-13.3	Corazón, SNC, retina
		Kir2.5	-	-	Corazón ( <i>Carassius carassius</i> )
		Kir2.6	KCNJ18	17p11.2	ME
<b>Kir3 (GIRK)</b>	$I_{K,ACh}$	Kir3.1	KCNJ3	2q24.1	Corazón, cerebelo
		Kir3.2	KCNJ6	21q22.13-22.2	Corazón, páncreas
		Kir3.3	KCNJ9	1q21-23	SNC
	$I_{K,ACh}$	Kir3.4	KCNJ5	11q24	Corazón, páncreas
<b>Kir4 (BIR10)</b>		Kir4.1	KCNJ10	1q22-q2	Glía
		Kir4.2	KCNJ15	21q22.2	Riñón, pulmón, SNC
<b>Kir5</b>		Kir5.1	KCNJ16	17q23.1-24.2	SNC, SNP
<b>Kir6</b>	$I_{K,ATP}$	Kir6.1	KCNJ8	12p11.23	Heterogénea
	$I_{K,ATP}$	Kir6.2	KCNJ11	11p15.1	Heterogénea
<b>Kir7</b>		Kir7.1	KCNJ13	2q37	SNC, riñón, tiroides

**Tabla I.2. Familias de canales de  $K^+$  2TM/1P en mamíferos.** ME: Músculo esquelético. ML: Músculo liso. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico.

Los canales Kir se pueden dividir en 4 grupos: los canales que participan en el mantenimiento del PR (Kir2), los canales acoplados a proteínas G (Kir3), los canales sensibles a ATP (Kir6) y los canales transportadores de  $K^+$  (Kir1, Kir4 y Kir7) (Figura I.12B).

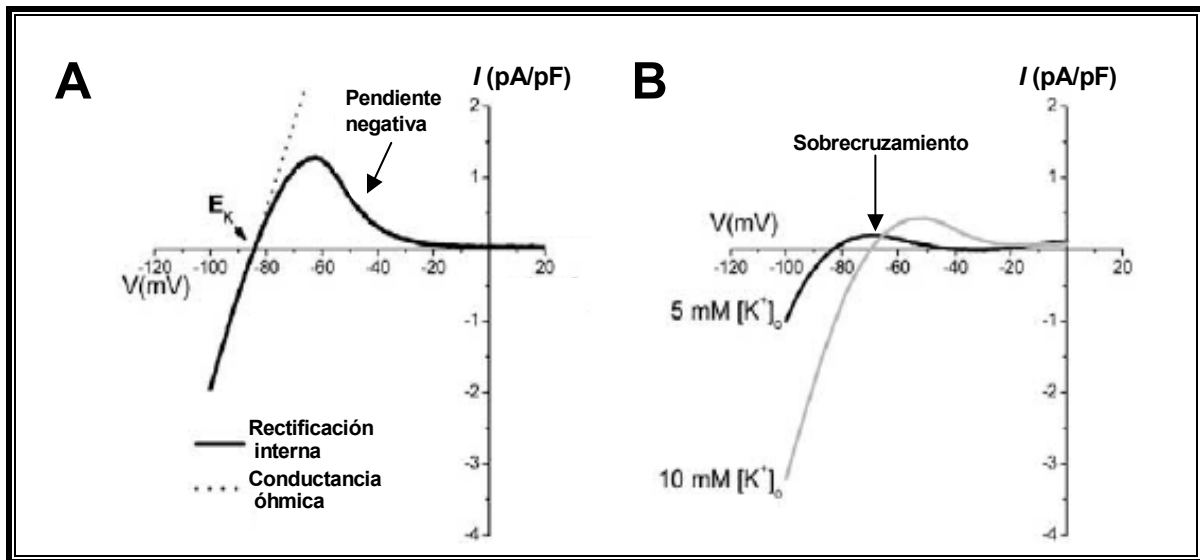
En el corazón, hay tres corrientes con rectificación interna. La principal de ellas es la  $I_{K1}$  cuya densidad es mayor en el ventrículo que en la aurícula. Por el contrario, la  $I_{K,ACh}$ , una corriente activada por la estimulación del receptor muscarínico  $M_2$ , presenta mayor densidad en el tejido auricular que en el ventricular. La  $I_{K,ACh}$  también está, presente en los nodos AV y SA, donde juega un papel muy importante en la regulación vagal de la frecuencia cardiaca. La tercera corriente es la regulada por las concentraciones intracelulares de ATP y ADP ( $I_{K,ATP}$ ) (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

### 3.2. La rectificación interna en los canales Kir

Los canales iónicos se pueden considerar como resistencias eléctricas situadas en la membrana plasmática que pasan cargas en forma de iones entre dos compartimentos (los medios intra y extracelular). Dada una resistencia la relación entre la intensidad de la corriente y el voltaje es lineal y se describe mediante la ley de Ohm (conductancia óhmica):

$$Intensidad = Voltaje / Resistencia \quad (I.7)$$

Las corrientes que presentan rectificación interna no tienen una relación I-V lineal puesto que en un rango de voltaje de entre -60 y -20 mV (dependiendo del canal y las concentraciones de  $K^+$  intra y extracelulares) se produce una reducción muy marcada de la amplitud de la corriente (“pendiente negativa”) (Figura I.13A). A potenciales más positivos de -20 mV la amplitud de la corriente se mantiene en valores mínimos). Como resultado los canales de  $K^+$  que presentan rectificación interna generan una corriente de entrada de gran amplitud a potenciales más negativos del  $E_K$ , mientras que a potenciales más positivos generan una corriente de salida de amplitud mucho menor (Figura I.13).



**Figura I.13. Características de la rectificación interna en la  $I_{K1}$ .** (A) Relación I-V de la corriente  $I_{K1}$ . Se muestra el  $E_K$  y la corriente esperada si el comportamiento del canal siguiese la ley de Ohm (línea punteada). (B) Efectos de la  $[K^+]_e$  sobre la  $I_{K1}$ . [Adaptadas de Dhamoon y Jalife, 2005]

Atendiendo a la intensidad de la rectificación interna podemos dividir los canales Kir como “muy rectificadores” (*strong inward rectifiers*) o “poco rectificadores”. Los rectificadores fuertes presentan una “pendiente negativa” y generan corrientes similares a las originalmente descritas por Katz en músculo esquelético (Katz, 1949). Sólo los canales Kir2 y Kir3 se ajustan a la definición de canales muy rectificadores, mientras que el resto (Kir1 y Kir4 a Kir7) son poco rectificadores (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

Otra propiedad exclusiva de estas corrientes es que la rectificación interna presenta dependencia de la  $[K^+]_e$ . En concreto, un aumento de la  $[K^+]_e$  produce una despolarización del  $E_K$ , un aumento de la probabilidad de apertura y el desplazamiento hacia potenciales más positivos de la relación I-V (en paralelo al desplazamiento del  $E_K$ ), dando lugar a un fenómeno de “sobrecruzamiento” (*crossover*) entre las relaciones I-V obtenidas para cada una de las diferentes  $[K^+]_e$  (Figura I.13B). Una importante consecuencia de este fenómeno es que la amplitud de la corriente aumenta a potenciales más positivos del punto de “sobrecruzamiento” en lugar de disminuir, como sería de esperar debido a la reducción de la fuerza electromotriz que se produce al aumentar la  $[K^+]_e$  (Figura I.13B).



### 3.2.1. Mecanismos moleculares de la rectificación interna

Hace 40 años, Clay Armstrong sugirió que la rectificación interna podría deberse al bloqueo dependiente de voltaje del poro iónico por una molécula cargada positivamente, y que la disociación de este bloqueante de su sitio de unión al canal por el  $K^+$  extracelular explicaría la anómala dependencia de la  $[K^+]_e$  que presenta la corriente de salida (Armstrong, 1969). A finales de los años 80, se demostró que el  $Mg^{2+}$  intracelular puede ocasionar la rectificación interna de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares a través del bloqueo del poro del canal (Matsuda y cols., 1987; Vanderberg, 1987), aunque el bloqueo voltaje-dependiente producido por el  $Mg^{2+}$  no era suficiente como para explicar la rectificación interna (Oliva y cols., 1990; Martin y cols., 1995). A partir de entonces, diversos trabajos demostraron que las propiedades básicas de la rectificación interna se podían explicar por el potente bloqueo dependiente de voltaje producido por una familia de cationes orgánicos intracelulares denominados poliaminas (espermina, espermidina y putrescina) (Fakler y cols., 1994; Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994; Fakler y cols., 1995).

Las poliaminas están presentes en todos los tipos celulares y sus concentraciones intracelulares alcanzan el rango milimolar bajo (Cohen, 1998). Sin embargo, sólo las poliaminas libres originan la rectificación de los canales Kir (Yan y cols., 2005) y la mayoría de las poliaminas se encuentran unidas a diferentes moléculas intracelulares como el ADN, el ARN o el ATP (Watanabe y cols., 1991). Entre las poliaminas, la espermina (tetraivalente) es la más potente a la hora de ocasionar rectificación interna, seguida de la espermidina (trivalente) y la putrescina (divalente) y la cadaverina (divalente) (Figura I.14C) (Lopatin y cols., 1994; Baronas y cols., 2014). De acuerdo por tanto con el conocimiento actual, la rectificación interna es consecuencia de la entrada de poliaminas y  $Mg^{2+}$  en el interior del poro iónico que son repelidos desde interior celular por la despolarización. Por el contrario la hiperpolarización del interior celular atrae a las poliaminas y el  $Mg^{2+}$  lo que produce su disociación de sus sitios de unión en el poro.

### 3.2.2. Determinantes moleculares de la rectificación interna

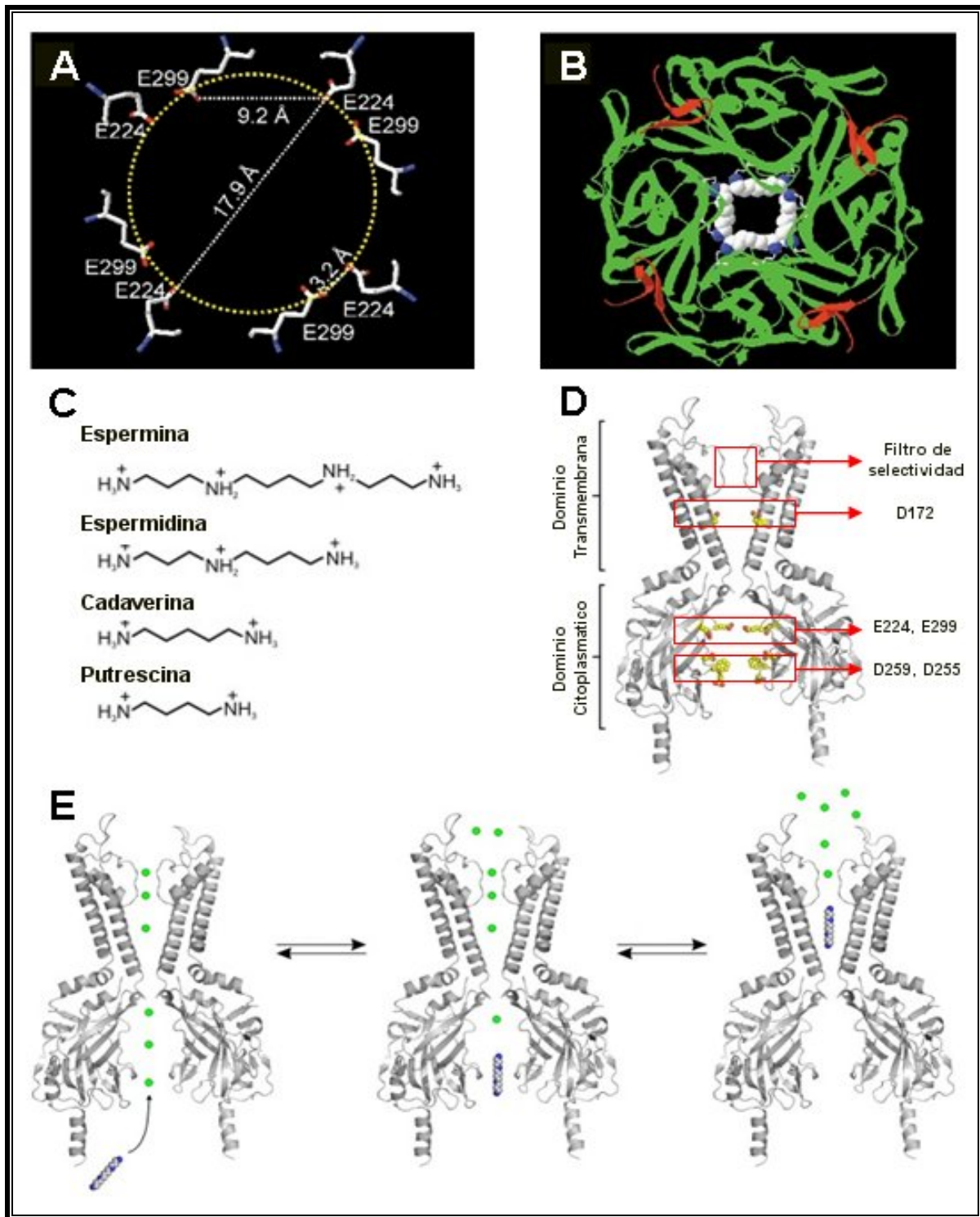
Se han identificado varios aminoácidos que resultan críticos en la rectificación de los canales Kir. Entre ellos destacan un ácido aspártico localizado en el M2 a la altura de la cavidad hidrófila (correspondiente al D172 en la subunidad Kir2.1) (Lu y MacKinnon, 1994;

Stanfield y cols., 1994; Yang y cols., 1995a) y dos ácidos glutámicos localizados en la porción citoplásmica (correspondientes a los residuos E224 y E299 en la subunidad Kir2.1) (Yang y cols., 1995a; Kubo y Kurata, 2001; John y cols., 2004).

Se ha demostrado que las poliaminas se unen con gran afinidad a un sitio de unión en el que participa el D172 y que se encuentra próximo al filtro de selectividad, mientras que el anillo acídico formado por el E224 y el E299 constituye un sitio de unión de baja afinidad (Figura I.14D) (Xie y cols., 2003; John y cols., 2004). Sin embargo, estos residuos no son los únicos responsables de la rectificación y, de hecho, se ha demostrado la implicación de otros residuos cargados (los ácidos aspárticos en las posiciones 255 y 259, principalmente) (Pegan y cols., 2005; Fujiwara y Kubo, 2006; Kurata y cols., 2007; Baronas y cols., 2014).

Se ha relacionado la cantidad de cargas negativas presentes en la cavidad hidrófila del poro con el grado de rectificación que presenta el canal (Pegan y cols., 2005). Así, los canales que presentan mayor rectificación (Kir2) presentan 5 cargas negativas (los residuos D172, E224, D255, D259 y E299 en Kir2.1) mientras que un canal poco rectificador como es el Kir6.2 sólo presenta una de estas cargas. Sin embargo, la cantidad de cargas negativas no es capaz de explicar por sí sola el fenómeno de la rectificación ya que existen excepciones, como el canal Kir4.1 (muy rectificador, aunque presenta “sólo” 3 cargas) (Fakler y cols., 1996a) o el canal Kir7.1 (poco rectificador, aunque también presenta 3 cargas) (Döring y cols., 1998).

Diversos autores han propuesto mecanismos diferentes para explicar la rectificación (Aleksandrov y cols., 1996; Lee y cols., 1999) ya que existen ciertos detalles del mecanismo de bloqueo, como el origen de la dependencia de voltaje de la rectificación (Shin y Lu, 2005) que siguen sin haber sido plenamente resueltos.



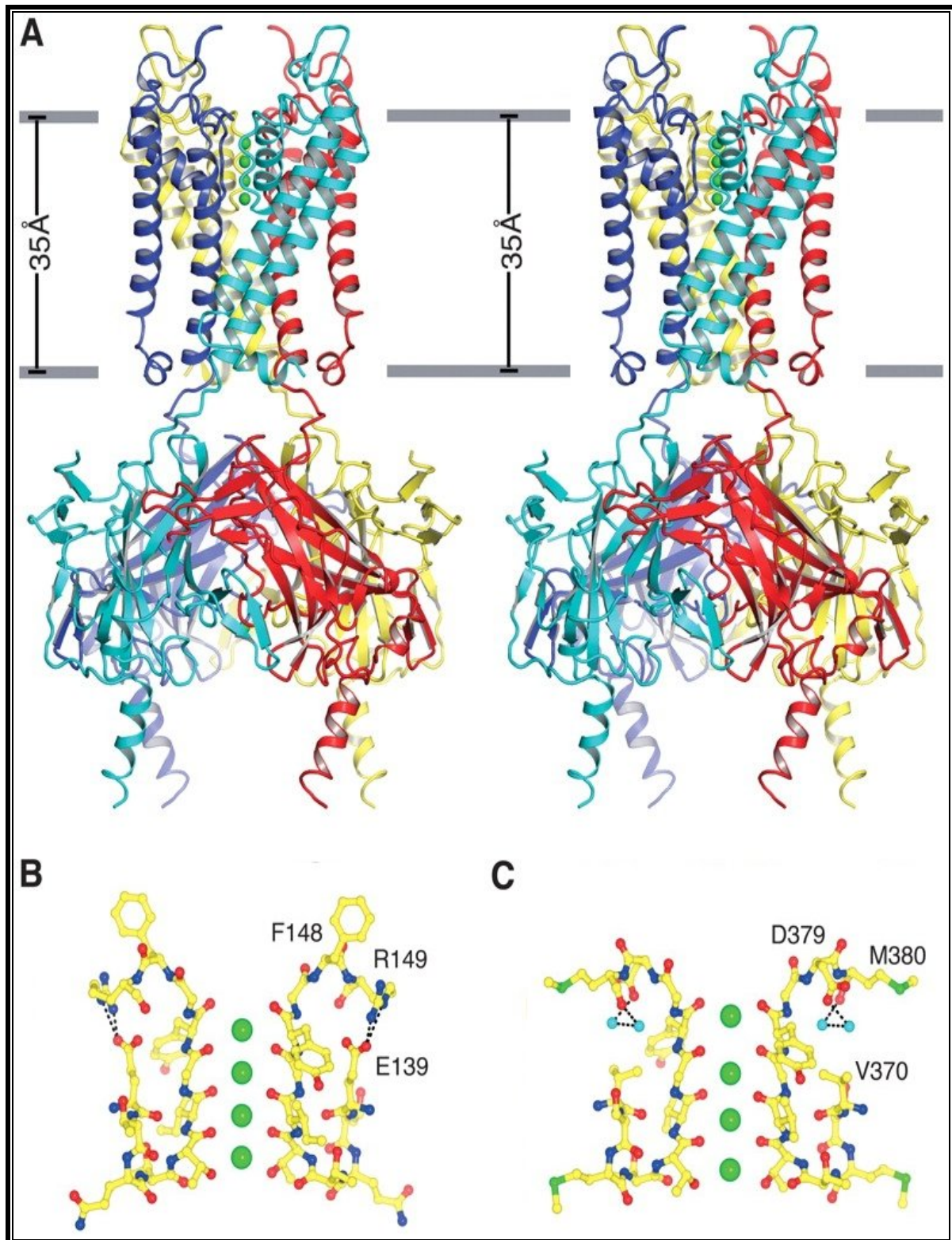
**Figura I.14. Determinantes moleculares de la rectificación interna inducida por poliaminas.** (A) Vista cenital de la región del poro citoplásmico de Kir2.1, con los residuos E224 y E299 orientados hacia el poro y 4 moléculas de diamina (DA8) unidas a ellos. (B) Representación esquemática de la geometría de la región del poro citoplásmico en la que se muestran las distancias intra e intermoleculares entre los residuos E224 y E299. (C) Poliaminas naturales. (D) Estructura general de los canales Kir. Recuadros en rojo se encuentran el filtro de selectividad y los residuos D172, E224, E299, D259 y D255. (E) Modelo de coordinación entre el sitio de unión de las poliaminas en el poro TM (D172) y los sitios de unión en el poro citoplásmico (E224 y E299). [Adaptadas de Xie y cols., 2003 (A) y (B), Baronas y cols., 2014 (C), (D) y (E)]

### 3.3. Estructura de los canales Kir

Atendiendo a su secuencia, los canales Kir presentan una homología mayor que la de otros canales de  $K^+$ . Esta homología no se reduce sólo a los segmentos TM (como ocurre en los canales Kv, por ejemplo), sino que se extiende desde aproximadamente 40 aminoácidos antes del primer segmento TM (denominado M1) hasta alrededor de 200 aminoácidos más allá del segundo segmento TM (denominado M2), lo que significa casi los dos tercios de la proteína y sugiere que estas regiones se encuentran formando una estructura organizada, posiblemente con una función común para todos los canales Kir.

- Dominio TM

Los primeros canales 2TM/1P cristalizados fueron los canales bacterianos *KcsA* (Doyle y cols., 1998) y *MthK* (Jiang y cols., 2002a y 2002b). La estructura resuelta para ambos canales demuestra que están formados por cuatro subunidades  $\alpha$  dispuestas simétricamente alrededor de un poro central. En cada subunidad se observan dos segmentos TM con una estructura de hélice  $\alpha$  (M1 y M2) y segmentos N- y C-terminales intracelulares. El M1 y el M2 están conectados por una secuencia de aproximadamente 30 aminoácidos (“lazo P”) en la que se encuentra una porción con estructura en hélice  $\alpha$  (denominada H5) y el filtro de selectividad del canal (Doyle y cols., 1998; Jiang y cols., 2002a y 2002b). El segmento M2 tapiza la luz del poro, mientras que el segmento M1 se encuentra retranqueado, embebido en la membrana lipídica.



**Figura 1.15. Canales 2TM/1P.** (A) Estructura del canal Kir2.2. Cada una de las cuatro subunidades del tetrámero aparece en diferente color. (B). Filtro de selectividad del canal Kir2.2. (C) Filtro de selectividad de la quimera Kv1.2-Kv2.1. En B y C, carbono (amarillo); nitrógeno (azul); oxígeno (rojo); sulfuro (verde); esferas verdes (K<sup>+</sup>); puentes de hidrógeno ionizados indicados con líneas negras discontinuas. [Adaptada de Tao y cols., 2009]

Posteriormente, se resolvió la estructura de los canales bacterianos *KirBac1.1* (Kuo y cols., 2003) y *KirBac3.1* (Kuo y cols., 2005), muy similares a los canales anteriormente descritos pero con una pequeña hélice adicional (“*slide helix*”) situada en el extremo N-terminal del M1 y paralela a la membrana plasmática.

En 2009 se consiguió resolver la estructura completa del canal Kir2.2 de pollo (Figura I.15A) (Tao y cols. 2009). Fue la primera vez que se conseguía cristalizar la estructura completa de un canal Kir eucariota, que comparte un grado elevado de homología tanto con canales Kir2 humanos como con *KirBac1.1* (Figura I.16). Posteriormente en 2011 se resolvería la estructura de este mismo canal en su configuración abierta unida a PIP<sub>2</sub> (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) (Hansen y cols. 2011).

Pese a la pequeña diferencia entre los radios atómicos del K<sup>+</sup> (1.33 Å) y del Na<sup>+</sup> (0.95 Å), los canales de K<sup>+</sup> son capaces de discriminar entre ambos iones con una selectividad superior a 1000 veces y conseguir una velocidad de conducción de  $\approx 10^8$  iones/s. El filtro de selectividad se encuentra en una región del lazo P formada por una secuencia de aminoácidos (T/SxxTxGYG) altamente conservada en todos los canales de K<sup>+</sup> denominada “secuencia de selectividad al K<sup>+</sup>” (Figura I.15B y C) (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y cols., 1994; Tao y cols., 2009). A excepción de los aminoácidos que forman el filtro de selectividad, los aminoácidos que forman parte de las paredes del poro son hidrofóbicos para minimizar la interacción electrostática del K<sup>+</sup> con el canal y crear una ruta de baja resistencia que permita fácilmente el paso del ion hidratado desde el citoplasma hasta la cavidad central, donde alcanza una concentración muy elevada ( $\approx 2$  M) (Zhou y cols., 2001).

Una vez en la cavidad central, el ion K<sup>+</sup> pierde su capa de solvatación para acceder al filtro de selectividad. Para compensar el coste energético que supone la deshidratación del ion al atravesar el filtro, los átomos de oxígeno de los radicales carbonilos de los residuos TxGYG hacen las veces de moléculas de agua, de manera que, durante su paso a través del filtro de selectividad, los iones K<sup>+</sup> se encuentran rodeados de 8 átomos de oxígeno en una disposición similar a la que adoptan las moléculas de agua que rodean a los iones K<sup>+</sup> en el medio acuoso (Figura I.15B y C) (Roux y MacKinnon, 1999; Zhou y MacKinnon, 2003). Además, el filtro de selectividad presenta una longitud de  $\approx 12$  Å, por lo que se ha postulado que a lo largo del filtro pueden llegar a encontrarse 2 iones K<sup>+</sup> ( $\approx 2.7$  Å) (Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y MacKinnon, 2003), de manera que la entrada del segundo ion produciría una repulsión electrostática mutua suficiente para compensar la atracción del filtro de

selectividad por el primer ion  $K^+$  y así producir su salida hacia el espacio extracelular (Doyle y cols., 1998).

- Dominio citoplásmico

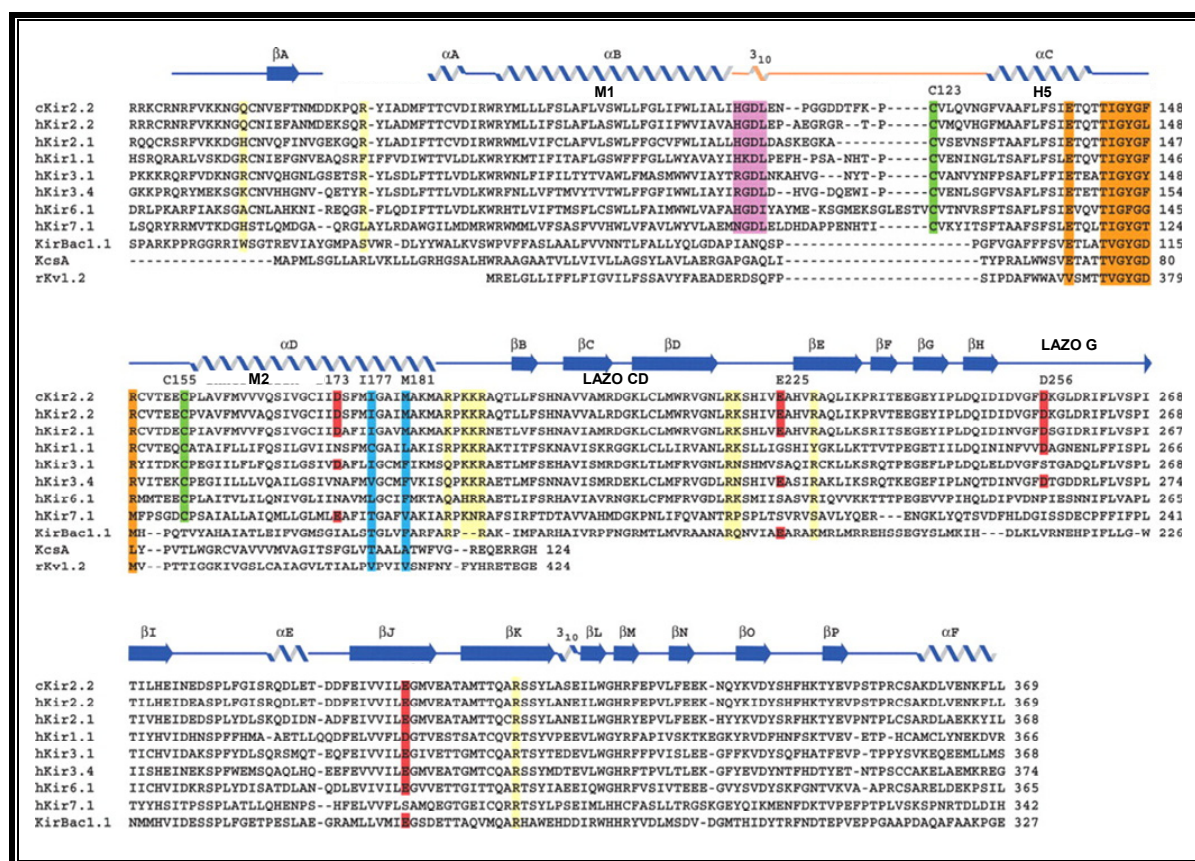
La estructura cristalizada del canal KirBac1.1 se complementa con la de los dominios intracelulares de los canales de mamífero Kir3.1 (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005) y Kir2.1 (Pegan y cols., 2005). Ambas estructuras comprenden una pequeña porción del extremo N-terminal (aminoácidos del 41 al 64 del Kir2.1 y del 41 al 63 del Kir3.1) y el extremo C-terminal casi completo (aminoácidos del 189 al 428 del Kir2.1 y del 189 al 371 del Kir3.1) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005). Además, ambos dominios citoplásmicos fueron cristalizados en ausencia de  $PIP_2$ , un mediador intracelular muy importante en la regulación de la actividad de los canales Kir, por lo que se ha propuesto que estas estructuras representan el estado cerrado del canal (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005). Finalmente en 2011 se pudo cristalizar el canal Kir2.2 de pollo unido a  $PIP_2$  mostrando la configuración más abierta del canal (Hansen y cols., 2011), y comparando con los resultados obtenidos de Kir2.2 en su configuración cerrada (Tao y cols., 2009) se propuso un mecanismo de activación de éste canal por  $PIP_2$  (Hansen y cols., 2011).

El dominio citoplásmico de los canales Kir está formado por aminoácidos de las cuatro subunidades del tetrámero y forma un poro central que permite el paso de los iones  $K^+$  conocido como “poro citoplasmático”. La longitud del poro citoplásmico de los canales Kir es, al menos, la misma que la del poro que forman los segmentos TM (Figura I.14), lo que hace que estos canales presenten dos poros en “tandem” con una longitud total que es aproximadamente el doble de la de otros canales de  $K^+$  ( $\approx 60$  Å) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005). Además, diferentes estudios han permitido determinar que el diámetro del poro citoplásmico es de  $\approx 20$  Å en estado abierto (Lu y cols., 1999) y de entre 7 y 15 Å en estado cerrado (Nishida y MacKinnon, 2002), es decir, lo suficientemente amplio como para permitir la presencia de los iones hidratados en su interior en ambos casos.

Las estructuras resueltas muestran una elevada organización en los dominios citoplásmicos de los canales Kir3.1, Kir2.1 y Kir2.2 (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005; Tao y cols., 2009), habiéndose descrito la presencia de 2 hélices  $\alpha$  ( $\alpha A$  y  $\alpha B$ ) y 14 segmentos  $\beta$  ( $\beta A$  a  $\beta N$ ) (Figura I.16). Básicamente, en cada subunidad se distinguen tres elementos: dos láminas  $\beta$  (formadas por los segmentos  $\beta D$ ,  $\beta E$ ,  $\beta H$  y  $\beta I$  la primera y por los segmentos  $\beta B$ ,  $\beta C$ ,  $\beta G$  y  $\beta J$  la segunda) que se encuentran en el interior de cada subunidad, y una tercera



lámina  $\beta$  (formada por los segmentos  $\beta A$ ,  $\beta L$  y  $\beta M$ ) que se dispone en el exterior, cerca de la cara interna de la membrana (Pegan y cols., 2005; Tao y cols., 2009). En esta tercera lámina, cada uno de los 4 segmentos  $\beta A$ , localizados en los extremos N-terminales (Figura I.16), interacciona con el extremo C-terminal de una subunidad vecina, por lo que se ha sugerido que estos segmentos participan en el ensamblaje de los dominios citoplásmicos de las subunidades Kir.



**Figura I.16. Alineamiento de las secuencias de varios canales Kir.** Residuos clave en canales Kir. La estructura secundaria está señalada encima de las secuencias. En rojo (residuos ácidos), verde (cisteínas que forman puentes disulfuro), cian (puerta de activación de la hélice interior), púrpura (residuos conservados entre las torretas de los canales Kir eucariotas), naranja (Filtro de selectividad), y amarillo (residuos críticos para la interacción canal-PIP<sub>2</sub>) [Adaptada de Tao y cols., 2009].

La parte más estrecha del dominio citoplásmico (2.8-5.7 Å) la constituyen dos lazos que se encuentran mirando hacia el poro, formados por los aminoácidos que se localizan entre los segmentos  $\beta C$  y  $\beta D$  (el “lazo CD”) y entre los segmentos  $\beta H$  y  $\beta I$  (el “lazo G”) (Figura I.16), y que se disponen como un anillo alrededor del eje del poro (Figura I.14B). Curiosamente, ambos lazos se encuentran precedidos por un residuo glicina (la Gly215 antes del lazo CD y la Gly300 antes del lazo G, según la numeración de Kir2.1), lo que sugiere que son secuencias que presentan cierta flexibilidad y movilidad. De hecho, según las estructuras cristalizadas de



Kir2.1 y Kir3.1, los lazos G de ambos canales presentan conformaciones diferentes, lo que confirma que se trata de estructuras suficientemente flexibles como para permitir los cambios conformacionales que tienen lugar con la activación del canal (Pegan y cols., 2005; Tao y cols., 2009).

En el canal Kir2.1, la alanina en posición 306 que se encuentra en la parte superior del lazo G constituye el punto de mayor estrechez del poro citoplásmico. Según las estructuras cristalizadas de los dominios intracelulares de Kir2.1 y Kir3.1, la apertura del poro iónico a este nivel no es lo suficientemente amplia como para permitir el paso de ningún ión  $K^+$ , lo que parece confirmar que ambas estructuras representan el estado cerrado del canal. Estudios de mutagénesis demuestran que la sustitución de esta alanina por cualquier otro aminoácido más voluminoso da como resultado canales no funcionales, posiblemente por cambios en la conformación del lazo P que impiden estéricamente el paso de iones  $K^+$  a través del poro (Pegan y cols., 2005; Tao y cols., 2009).

Los aminoácidos del lazo G parecen importantes tanto en la regulación de los canales Kir ya que, por ejemplo, la sustitución de la Cys311 del canal Kir2.1 por residuos polares (serina), cargados (arginina) o alifáticos (alanina) reduce la probabilidad de apertura y modifica el *gating* del canal Kir2.1 (Garneau y cols., 2003); por promover cambios alostéricos en el filtro de selectividad o por modificar la afinidad por el  $PIP_2$  (Lu y cols., 2001; Garneau y cols., 2003; Pegan y cols., 2005). Cabe destacar que tanto la propafenona como la flecainida se unen a esta Cys311 del canal Kir2.1 produciendo un aumento de la  $I_{Kir2.1}$  y de la  $I_{K1}$  ventricular pero en Kir2.2 y en Kir2.3 no se produce tal unión pues estos canales carecen de dicha cisteína en posición análoga (Figura I.20). Por lo tanto ni flecainida ni propafenona aumenta la  $I_{Kir2.2}$  o la  $I_{Kir2.3}$  (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Gómez y cols., 2014).

La cavidad central del poro citoplásmico presenta una alta concentración de residuos con carga negativa (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005), entre los que destacan dos anillos ácidos: el primero formado por dos ácidos glutámicos (E224 y E299), y el segundo, por dos ácidos aspárticos (D255 y D259) (Figura I.14). Como se ha mencionado previamente, ambos anillos están implicados en la rectificación interna que presentan estos canales (Xie y cols., 2003; John y cols., 2004; Pegan y cols., 2005; Fujiwara y Kubo, 2006; Kurata y cols., 2007). Dada la longitud del poro citoplásmico y la concentración de cargas negativas que presenta, Nishida y MacKinnon (2002) han propuesto la posibilidad de que se puedan concentrar varios iones  $K^+$  en esta región del poro. Como no existen sitios específicos de interacción entre esta región del poro y dichos iones, éstos estarían localizados al azar a lo

largo del poro (Nishida y MacKinnon, 2002). Con la despolarización de la membrana, se produciría la entrada en el poro de una molécula de poliamina (cargada positivamente) desde el medio intracelular, lo que desplazaría los iones  $K^+$  hacia el poro TM y, de ahí, al medio extracelular. Posteriormente, la interacción de la poliamina con sus sitios de unión bloquearía el poro completamente, impidiendo el paso de más iones  $K^+$  (Nishida y MacKinnon, 2002). Este mecanismo explicaría algunas de las características de la rectificación interna relacionadas con la dependencia de voltaje del bloqueo producido por poliaminas y cationes intracelulares (Lopatin y cols., 1994; Domene y cols., 2003).

La hélice  $\alpha$  presente en el extremo C-terminal del dominio citoplásmico (la hélice  $\alpha B$ ) protruye hacia el interior celular (Figura I.14D) (Nishida y MacKinnon, 2002). La porción del extremo C-terminal que se extiende más allá del segmento  $\beta N$  (donde se incluye esta hélice  $\alpha B$ ) presenta una homología mucho menor entre los diferentes canales Kir que el resto de la proteína, por lo que se puede descartar una función común de esta región para todos ellos. Sin embargo, si se compara la secuencia de esta hélice  $\alpha B$  de los miembros de una misma subfamilia, la homología sigue siendo muy elevada, por lo que se ha propuesto que puede estar participando en las interacciones del canal con otras proteínas o mediadores intracelulares. Esto ocurre, por ejemplo, para los 4 canales Kir regulados por proteínas G (canales Kir3.1-Kir3.4) (Yamada y cols., 1998), por lo que se ha sugerido que esta región podría participar en la regulación de los canales Kir3 por proteínas G (Albsoul-Younes y cols., 2001; Nishida y MacKinnon, 2002).

Más allá de la hélice  $\alpha B$ , la estructura del extremo C-terminal no ha podido ser cristalizada, lo que indica que esta región presenta una estructura extremadamente flexible y desordenada y/o que para formar una estructura rígida precisa de la presencia del extremo N-terminal completo (las estructuras de los dominios citoplásmicos cristalizados carecen de los 40 primeros aminoácidos de este extremo) (Ma y cols., 2011) o de otras proteínas citoplásmicas con las que interacciona (Pegan y cols., 2005). A este respecto, en esta región se ha identificado un dominio PDZ de interacción con proteínas de anclaje a la membrana (PSD-95, SAP102, PSD-93, SAP97, sintrofinas) (Cohen y cols., 1996; Nehring y cols., 2000; Gee y cols., 2000; Inanobe y cols., 2002; Leonoudakis y cols., 2001, 2004a y b, Milstein y cols., 2012).

### 3.4. Principales corrientes cardíacas generadas a través de canales Kir

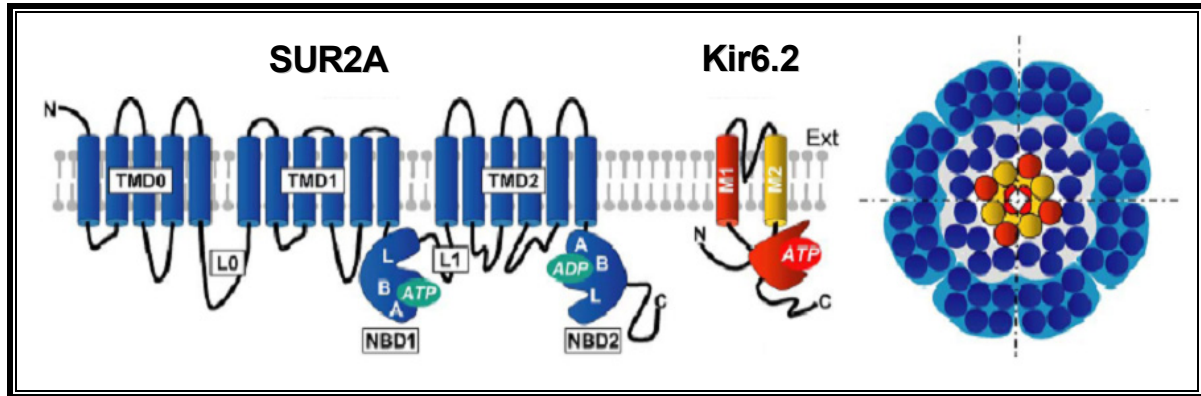
Dentro de la familia de canales Kir, las subfamilias Kir2, Kir3 y Kir6 son las que se expresan en el tejido cardíaco: los canales Kir2 participan en la formación de los canales que generan la  $I_{K1}$  (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), las subunidades Kir3.1 y Kir3.4 (pertenecientes al grupo de canales acoplados a proteínas G) forman el canal que genera la  $I_{K,ACh}$ , responsable de los efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos observados tras la estimulación vagal (Yamada y cols., 1998; Stanfield y cols., 2002), y las subunidades Kir6 heteromerizan con el receptor de sulfonilureas (SUR) para formar los canales que generan la corriente sensible a ATP ( $I_{K,ATP}$ ), responsable del acortamiento de la DPA que ocurre durante la isquemia (Nichols y cols., 1996; Seino y Miki, 2003). En este apartado I.3.4 describiremos la  $I_{K,ATP}$  y la  $I_{K,ACh}$  y en el siguiente apartado (I.3.5) detallaremos la  $I_{K1}$ .

#### 3.4.1. La $I_{K,ATP}$

##### 3.4.1.a. Características de la $I_{K,ATP}$ y composición de los canales que la generan

El canal  $K_{ATP}$  ventricular es el resultado de la asociación de 4 subunidades  $\alpha$  Kir6.2 con 4 subunidades auxiliares SUR2A (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016), mientras que en la aurícula parece que podrían asociarse subunidades Kir6.2 también a subunidades SUR1 (Nichols y cols., 2013; Foster y Coetzee, 2016). Se ha descrito, que en el sistema de conducción los canales  $K_{ATP}$  podrían estar formados también por subunidades Kir6.1 (Bao y cols., 2011). Las subunidades  $\alpha$  Kir6 están formadas por 2 segmentos TM (M1 y M2) y son las que confieren al canal la capacidad de ser regulado por el ATP (Tucker y cols., 1996). Las subunidades auxiliares SUR2A tienen 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos, NBD1 y NBD2 (*Nucleotide Binding Domain*), localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 y en la región C-terminal, respectivamente (Figura I.17) (Conti y cols., 2001; Seino y Miki, 2003). Estas subunidades son las que confieren al canal la sensibilidad al ADP, a las sulfonilureas y a los “activadores” del canal (Yokoshiki y cols., 1998; Moreau y cols., 2000; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016).

La hidrólisis del ATP en los dominios NBD de las subunidades SUR2A produce la activación del canal y permite el paso de  $K^+$  a través de la subunidad  $\alpha$  Kir6.2 (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003).



**Figura I.17. Estructura de los canales  $K_{ATP}$ .** Modelo estructural del canal  $K_{ATP}$  cardíaco formado por 4 subunidades Kir6.2 (en rojo y amarillo) y 4 subunidades SUR2A (en azul). Cada subunidad Kir6.2 está formada por 2 segmentos TM en  $\alpha$ -hélice y un largo dominio citoplásmico con el sitio de unión para el ATP. Cada subunidad SUR2A contiene 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 (L1) y en el extremo C-terminal. [Adaptada de Moreau y cols., 2005]

### 3.4.1.b. Regulación de la $I_{K_{ATP}}$

Los canales  $K_{ATP}$  permiten acoplar el  $E_m$  al metabolismo celular (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016) puesto que los canales son regulados por el cociente ATP/adenosín difosfato (ADP). La  $I_{K_{ATP}}$  se inhibe cuando aumenta el ATP intracelular, mientras que se activa por el ADP (Yellen, 2002). Sin embargo, diversos factores como otros nucleótidos difosfato, el lactato o algunos radicales libres derivados del  $O_2$  pueden producir la desensibilización del canal, es decir, la pérdida de su capacidad para ser regulado por el ATP (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016). Además, al igual que en los canales Kir2.1, el canal  $K_{ATP}$  está regulado por el  $PIP_2$  y otros lípidos de membrana. El  $PIP_2$  interactúa directamente con dos residuos arginina del extremo C-terminal de la subunidad Kir6.2 (R176 y R177), estabilizando el estado abierto del canal y antagonizando la inhibición producida por el ATP (Fan y Makielski, 1997; Lopatin y Nichols, 2001). En el mecanismo de rectificación de la  $I_{K_{ATP}}$  intervienen  $Mg^{2+}$  y  $Na^+$  intracelular (Horie y cols., 1987) además de las poliaminas que bloquean el canal de forma dependiente del pH (Baukrowitz y cols., 1999).

### 3.4.2. La $I_{K,ACh}$

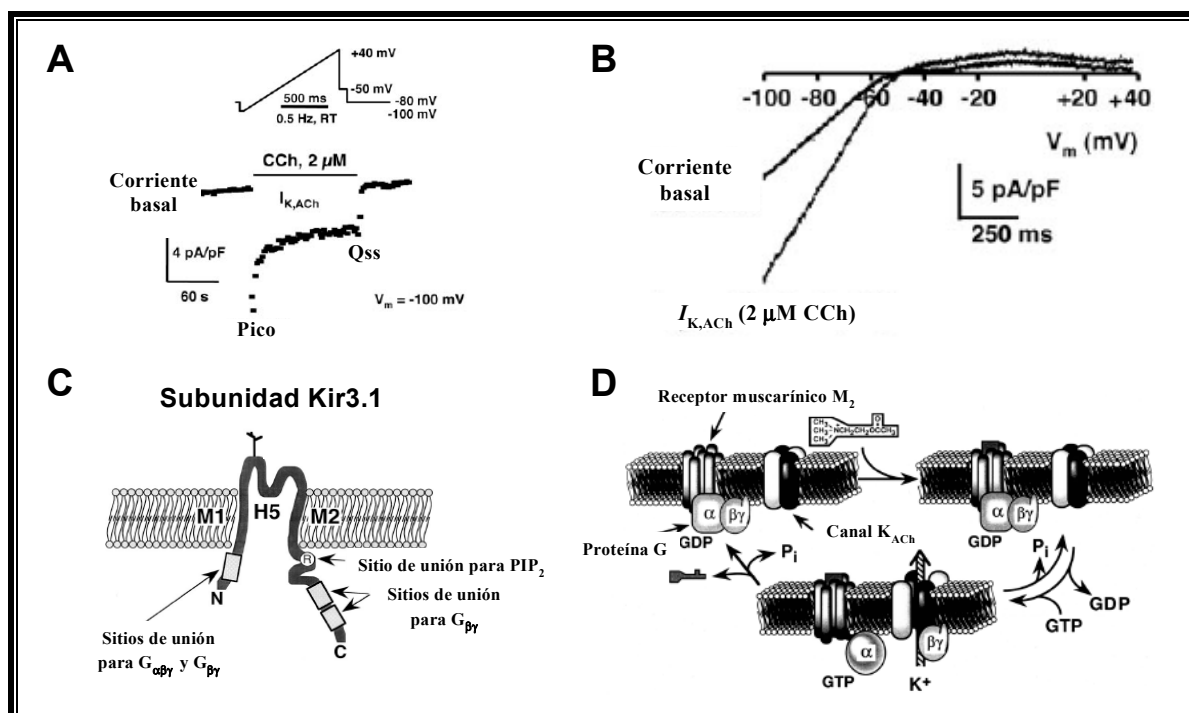
A principios del siglo XX, Otto Loewi describió que la liberación de ACh producida tras la estimulación vagal disminuía la frecuencia cardíaca (Loewi, 1921; Loewi y Navaratil, 1926). Posteriormente, el grupo del Prof. Trautwein analizó la cinética de la  $I_K$  inducida por ACh en el nodo SA de conejo y propusieron que la ACh activaba una población específica de canales (a los que llamaron  $K_{ACh}$ ) que retrasaba la actividad marcapasos del nodo SA (Noma y Trautwein, 1978; Osterrieder y cols., 1981).

#### 3.4.2.a. Características de la $I_{K,ACh}$

La densidad de los canales  $K_{ACh}$  es muy alta en las células marcapaso de los nodos SA (donde regula la frecuencia cardíaca) y AV (Mark y Herlitze, 2000). Además, juega un papel importante en el control de la DPA en el tejido auricular, donde la densidad de la  $I_{K,ACh}$  es 6 veces mayor que en el ventricular (Schram y cols., 2002).

La ACh estimula los receptores muscarínicos  $M_2$  y produce la apertura de los canales  $K_{ACh}$  que generan una corriente que se caracteriza principalmente por una activación de cinética sigmoideal dependiente de tiempo y de la dosis de agonista, por lo que se tardan cientos de milisegundos en alcanzar la amplitud máxima de la corriente (Breitwieser y Szabo, 1988). Posteriormente, y aunque la ACh esté todavía presente, se produce la disminución gradual de la corriente hasta que se alcanza un nivel cercano al estado estable, denominado “*quasi-steady-state*” (Qss) (Figura I.18A y B) (Kurachi y cols., 1987).

La apertura de los canales  $K_{ACh}$  inducida tras la estimulación del receptor  $M_2$  está mediada por una proteína G. La estimulación del receptor produce la disociación del complejo  $G_\alpha$ -GDP, lo que permite la formación del complejo  $G_\alpha$ -GTP que, a su vez, promueve la disociación del dímero  $G_{\beta\gamma}$  de la subunidad  $G_\alpha$ . El dímero  $G_{\beta\gamma}$  es la molécula que interactúa con el canal promoviendo su activación (Figura I.18C y D) (Yamada y cols., 1998).



**Figura 1.18. Características de la  $I_{K,ACh}$  y estructura de los canales  $K_{ACh}$ .** (A) Curso temporal de la  $I_{K,ACh}$  inducida por el agonista de receptores muscarínicos carbacol (CCh). Tras la estimulación con CCh se alcanza un pico de corriente cuya amplitud disminuye como consecuencia de la rápida desensibilización alcanzándose un nivel de corriente denominado “quasi-steady-state” (Qss). (B) Curva I-V en situación control y tras la aplicación de CCh. (C) Esquema representativo de la estructura de la subunidad Kir3.1, formada por 2 segmentos TM (M1 y M2) cuyos extremos N- y C-terminal son intracelulares y que están unidos entre si por el lazo H5. Se indican los sitios de unión de proteínas G y de  $PIP_2$ . (D) Representación esquemática del proceso de activación del canal  $K_{ACh}$  por proteínas G en respuesta a la activación del receptor muscarínico  $M_2$  tras la unión de ACh. [Adaptadas de Dobrev y cols., 2005 (A-B) y Yamada y cols., 1998 (C-D)]

La activación de la  $I_{K,ACh}$  hiperpolariza el  $E_m$  y reduce la frecuencia de disparo de las células del nodo SA, lo que explica su efecto cronotrópico negativo. Además, reduce la frecuencia de disparo y la velocidad de conducción a través del nodo AV, lo que explica por qué la estimulación vagal puede parar las taquiarritmias por reentrada intranodal (Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004).

### 3.4.2.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ACh}$

En el corazón humano, los canales que generan la  $I_{K,ACh}$  están formados por el ensamblaje de subunidades Kir3.1 y Kir3.4, que forman una estructura tetrámerica siguiendo una estequiometría 2:2 (Dascal y cols., 1993; Krapivinsky y cols., 1995; Yamada y cols., 1998), mientras que la presencia de Kir3.2 y Kir3.3 es mínima o incluso nula (Wickman y cols., 1998). Se ha postulado que la subunidad Kir3.1 requiere de la presencia de la subunidad Kir3.4 para formar el canal funcional (Kennedy y cols., 1996; Yamada y cols., 1998). De

hecho, se ha demostrado que los ratones Kir3.4<sup>-/-</sup> presentan una disminución de proteína Kir3.1 y una total ausencia de la  $I_{K,ACh}$  en el corazón (Wickman y cols., 1998). Las regiones N- y C-terminales de la subunidad Kir3.1 son las responsables de la unión del dímero  $G_{\beta\gamma}$  al canal, aunque se ha propuesto que el extremo N-terminal de la subunidad Kir3.4 también participa en esta unión (Huang y cols., 1995; Tucker y cols., 1996).

#### 3.4.2.c. Regulación de la $I_{K,ACh}$

La  $I_{K,ACh}$  es estimulada por el ATP intracelular, el PIP<sub>2</sub> y por agonistas de los receptores  $\mu$ -opioides,  $\alpha_2$ -adrenérgicos, de adenosina A1 (esto explica el porqué la administración intravenosa de adenosina se utiliza para detener las taquiarritmias por reentrada intranodal) y de endotelina ET<sub>A</sub> e inhibida por la distensión de la membrana (dependiente de la subunidad Kir3.4) y la acidificación del medio intracelular (Ji y cols., 1998; Shieh y cols., 2000; Tamargo y cols., 2004).

La inhibición farmacológica de la  $I_{K,ACh}$  puede ser directa (flecainida y propafenona) o indirecta vía los receptores muscarínicos M<sub>2</sub> (isopiramina, procainamida, quinidina o verapamilo) (Ito y cols., 1989; Inomata y cols., 1993). Tanto el Ba<sup>2+</sup> como el Cs<sup>+</sup> aplicados extracelularmente inhiben la  $I_{K,ACh}$  de manera dependiente de voltaje (Carmeliet y Mubagwa, 1986).

### 3.5. La $I_{K1}$

Hace más de 50 años, cuando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos estaba apenas empezando a desarrollarse, uno de sus pioneros, Silvio Weidmann (Weidmann, 1955b), demostró que en las fibras de Purkinje del corazón de oveja existía una corriente rectificadora interna (denominada posteriormente  $I_{K1}$ ) similar a la que Bernard Katz había descrito en músculo esquelético en 1949 (Katz, 1949). Posteriormente se describieron corrientes con propiedades de rectificador interno en trabéculas y músculos papilares de ventrículo de perro (Mascher y Peper, 1969; Beeler y Reuter, 1970), así como en tejido auricular (Rougier y cols., 1968). Estos primeros estudios describían también el papel de la  $I_{K1}$  en el mantenimiento del PR de los miocitos cardíacos (Hutter y Noble, 1960; Hall y cols., 1963; Noble, 1965; McAllister y Noble, 1966).

### 3.5.1. Rectificación interna y excitabilidad cardiaca

A potenciales más negativos que el PR, la  $I_{K1}$  presenta una conductancia mucho mayor que cualquier otra corriente, por lo que es la corriente encargada de fijar el PR cerca del  $E_K$ . Cuando se genera un PA los canales se mantienen cerrados durante toda la fase de meseta y se abren a potenciales más negativos que -20 mV, por lo que la  $I_{K1}$  contribuye también forma crítica a la repolarización durante el final de la fase 3 (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

De hecho, Zaritsky y cols. demostraron que la ausencia de la  $I_{K1}$  en ratones a los que se abolía los dos alelos del gen *KCNJ2* (ratones Kir2.1<sup>-/-</sup>) produce una despolarización del PR y un aumento de la actividad espontánea en miocitos ventriculares que se acompaña de una prolongación de la DPA (Zaritsky y cols., 2000 y 2001). De la misma forma, en ratones transgénicos a los que se les suprimía la  $I_{K1}$  en un 90% mediante la transfección de un dominante negativo de Kir2.1 (Kir2.1-AAA), que forma canales no funcionales porque tiene mutado el filtro de selectividad, produce una prolongación de la DPA y de los intervalos QRS y QT (McLerie y Lopatin, 2003). Sorprendentemente, el PR de los miocitos ventriculares de estos ratones no se modificaba (McLerie y Lopatin, 2003). En corazones de cobayos en los que también se suprimía la  $I_{K1}$  mediante la transfección de Kir2.1-AAA, se observó además actividad automática en algunos miocitos y, en los registros del ECG, latidos prematuros de origen ventricular (Miake y cols., 2002 y 2003).

Por el contrario, en ratones transgénicos que sobreexpresan Kir2.1, el aumento de la  $I_{K1}$  produce un acortamiento significativo de la DPA y arritmias tanto auriculares como ventriculares (Li y cols., 2004; Piao y cols., 2007b). Noujaim y cols. han demostrado que este aumento de la  $I_{K1}$  permite la estabilización de los frentes espirales de reentrada de alta frecuencia (denominadas rotores), actividad que se suprimía con la administración de concentraciones bajas de Ba<sup>2+</sup>, un inhibidor de la  $I_{K1}$  (Noujaim y cols., 2007).

Cada vez hay más evidencias de que una excesiva heterogeneidad en la repolarización es un factor que determina la aparición de inestabilidad eléctrica en el corazón, insistiendo en la importancia del papel que juega la  $I_{K1}$  en la estabilidad eléctrica cardiaca. En este sentido, estudios realizados en corazones de cobayo sugieren que el gradiente existente entre el ventrículo izquierdo y el derecho en la amplitud de la  $I_{K1}$  puede contribuir a la perpetuación de las arritmias por reentrada en el ventrículo en el cuál la densidad es mayor (el izquierdo) (Samie y cols., 2001). Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de la  $I_{K1}$  es



fundamental para la terminación de arritmias ventriculares inducidas en corazones de animales de esta misma especie (Warren y cols., 2003). Asimismo, experimentos en los que se suprimen/sobreexpresan los canales Kir2.1 en un cultivo en monocapa de cardiomiocitos neonatales de rata han demostrado la importancia de la heterogeneidad de la  $I_{K1}$  en la génesis y mantenimiento de los circuitos de reentrada (Sekar y cols., 2009).

La marcada e inusual dependencia de la  $[K^+]_e$  que presenta la  $I_{K1}$  es otro de los mecanismos por el que esta corriente participa en la regulación de la excitabilidad cardiaca. La actividad normal del corazón conlleva grandes variaciones de la  $[K^+]_e$  en el reducido espacio intercelular (entre 0.01 y 5  $\mu$ M) (Kline y Morad, 1976; Kline y cols., 1980). Es más, en las fibras de Purkinje, la  $[K^+]_e$  puede sufrir un aumento transitorio con cada latido hasta alcanzar concentraciones en el rango milimolar (Kline y cols., 1980) e incluso existen regiones o estructuras celulares, como los túbulos T, donde la acumulación de  $K^+$  puede llegar a ser mayor (Almers, 1972; Clark y cols., 2001). El incremento de la  $I_{K1}$  asociado a esos aumentos transitorios de la  $[K^+]_e$  tiene consecuencias en la actividad eléctrica cardiaca, modificando, por ejemplo, la DPA o la propagación del impulso cardiaco (Kline y cols., 1980; Coulombe y Coraboeuf, 1983; Nygren y Giles, 2000).

Por último, a pesar de que está ampliamente descrito el papel de la  $I_{K1}$  en la fase final de la repolarización del PA y su participación en la onda T del ECG, se desconoce qué corriente es la responsable (o cuáles, en el caso de que hubiera más de una) de la aparición de la onda U. Sin embargo, recientemente, el análisis de los ECG de pacientes portadores de diferentes mutaciones en el gen *KCNJ2* (Kir2.1) ha sugerido que la amplitud de la onda U viene determinada por la densidad de la  $I_{K1}$  (Postema y cols., 2009).

### 3.5.2 Densidad de la $I_{K1}$ en los distintos tejidos cardiacos

En todas las especies estudiadas la densidad de la  $I_{K1}$  es mucho mayor en el tejido ventricular que en el auricular (Shah y cols., 1987; Giles e Imaizumi, 1988; Varro y cols., 1993; Melnyk y cols., 2002; Dhamoon y cols., 2004) exceptuando en el ratón (Lomax y cols., 2003). Las propiedades de la rectificación de la  $I_{K1}$  también varían entre células ventriculares y auriculares, ya que a potenciales despolarizantes la corriente de salida de  $K^+$  es prácticamente nula en células auriculares, mientras que en las ventriculares su amplitud es mucho mayor (Giles e Imaizumi, 1988; Koumi y cols., 1995a). Estas diferencias en la rectificación pueden deberse a que la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  en ambas

cámaras sea distinta. En este sentido, Melnyk y cols. demostraron la expresión preferencial de los canales Kir2.3 frente a los Kir2.1 en los miocitos auriculares de perro, mientras que en el tejido ventricular ocurría lo contrario (Melnyk y cols., 2002). Estos resultados coinciden con los descritos para el tejido miocárdico humano. Gaborit y cols. demostraron que la expresión de canales Kir2.3 es máxima en el tejido auricular mientras que es residual en el tejido ventricular humano. Por el contrario la expresión de canales Kir2.1 en el tejido ventricular humano es muy alta (Gaborit y cols., 2007) lo que sugiere que en él los canales Kir2.1 forman homotetrámeros. Otras hipótesis que explicarían las diferencias en la densidad de la  $I_{K1}$  y la intensidad de la rectificación entre tejido auricular y ventricular es que los canales de los dos tejidos presenten diferente sensibilidad a las poliaminas o que las concentraciones intracelulares de poliaminas sean diferentes en aurículas y ventrículos (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

La densidad de la  $I_{K1}$  es también diferente en ambos ventrículos y en las distintas regiones de un mismo ventrículo. De manera general, la  $I_{K1}$  es mayor en el ventrículo derecho que en el izquierdo (Brunet y cols., 2004; Panama y cols., 2007), aunque existen excepciones como el cobayo, donde es justo al contrario (izquierdo > derecho) (Warren y cols., 2003). En el ventrículo izquierdo del ratón, la densidad de la  $I_{K1}$  es mayor en miocitos apicales que en miocitos epicárdicos (Brunet y cols., 2004), mientras que en el ventrículo izquierdo de gato, la  $I_{K1}$  es mayor en las células endocárdicas que en las epicárdicas (Furukawa y cols., 1992).

La densidad de la  $I_{K1}$  es pequeña en las células del nodo SA de ratón y de rata (Shinagawa y cols., 2000; Cho y cols., 2003) e indetectable en las mismas células de conejo (Shinagawa y cols., 2000). La menor presencia de la  $I_{K1}$  en las células del nodo SA permite el desarrollo de la actividad automática y que el potencial diastólico máximo esté relativamente despolarizado ( $\approx -50$  mV) (Schram y cols., 2002).

En prácticamente todos los tipos celulares cardíacos en los que se ha registrado la  $I_{K1}$ , se ha identificado la presencia de canales Kir en el sarcolema (Anumonwo y Lopatin, 2010). La presencia de dichos canales en los túbulos T es indiscutible, ya que la pérdida de los túbulos T que se produce a corto plazo en miocitos en cultivo se acompaña de una reducción significativa de la  $I_{K1}$  (Lipp y cols., 1996; Mitcheson y cols., 1996; Christie, 1999). Estos resultados se han visto confirmados además mediante experimentos en los que se estudia el efecto de la acumulación/depleción de  $K^+$  en los túbulos T sobre la corriente. Clark y cols. han demostrado que en miocitos ventriculares de ratón se produce un aumento significativo de las corrientes de cierre de la  $I_{K1}$  en respuesta a un gran flujo de salida de iones  $K^+$  previo

(con el consiguiente aumento de la  $[K^+]_e$ ), lo que es consistente tanto con la acumulación de  $K^+$  en el espacio intercelular como con la localización de la  $I_{K1}$  en el restringido espacio de los túbulos T (Clark y cols., 2001). Además, el marcaje mediante anticuerpos específicos para canales Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 demuestra la localización de éstos en los túbulos T de los miocitos ventriculares (Clark y cols., 2001; Leonoudakis y cols., 2001; Melnyk y cols., 2002).

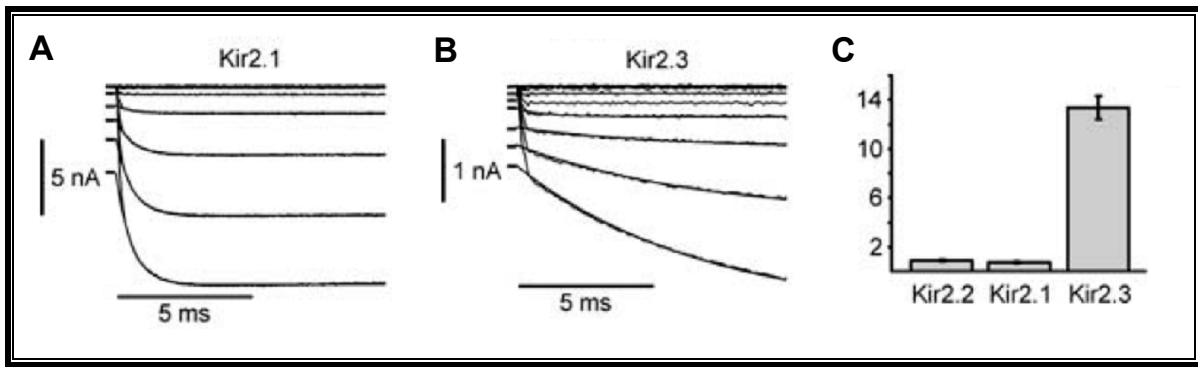
### 3.5.3. Propiedades de los canales Kir2

Hasta la fecha se han clonado 5 miembros de la familia Kir2 (Kir2.1, 2.2, 2.3, 2.4 y 2.6) en mamíferos. La expresión de los canales Kir2.4 en el corazón es mínima (sólo se ha demostrado su presencia en las neuronas miocárdicas) (Liu y cols., 2001). La expresión de Kir2.6 únicamente se ha demostrado en músculo esquelético (Ryan y cols., 2010), y la de Kir2.5 no se ha demostrado hasta la fecha en mamíferos (Hassinen y cols., 2008).

Subunidad	Conductancia (pS)	Sensibilidad al $Ba^{2+}$	Sensibilidad al pH extracelular	Sensibilidad al pH intracelular
Kir2.1	20-31	++	-	+
Kir2.2	34-42	+++	-	+
Kir2.3	10-14	+	+++	+++
Kir2.4	$\approx 15$	+	+++	?
Kir2.6	$\approx 34$	?	?	?

**Tabla I.3. Propiedades de los canales Kir2 expresados en sistemas heterólogos.** La diferencia en la sensibilidad al  $Ba^{2+}$  y al pH entre los canales Kir2 va desde los muy sensibles (+++) hasta los poco (+) o nada (-) sensibles. Tanto las sensibilidades de Kir2.6 al  $Ba^{2+}$ , al pH extra e intracelular como la sensibilidad de Kir2.4 al pH intracelular no han sido determinadas todavía experimentalmente.

Los miembros de la subfamilia Kir2 presentan diferentes características que se resumen en la (Tabla I.3). Exceptuando los canales Kir2.2 y 2.6 que guardan una gran homología en su secuencia (99%) y presentan conductancias muy similares, el resto de canales Kir2.x presentan conductancias específicas que los diferencian entre si (Kubo y cols., 1993a; Morishige y cols., 1993; Makhina y cols., 1994; Morishige y cols., 1994; Perier y cols., 1994; Raab-Graham y cols., 1994; Takahasi y cols., 1994; Wible y cols., 1995; Töpert y cols., 1998; Choe y cols., 2000; Liu y cols., 2001; Ryan y cols., 2010) y diferencias en la sensibilidad al  $Ba^{2+}$  (Liu y cols., 2001; Preisig-Muller y cols., 2002; Schram y cols., 2003), y al pH intracelular (Qu y cols., 2000; Collins y Larson, 2002) y extracelular (Hughes y cols., 2000; Yan y cols., 2005; Muñoz y cols., 2007).



**Figura I.19. Cinética de activación de los canales Kir2.** (A-B) Trazos representativos de corrientes generadas por los canales Kir2.1 (A) y Kir2.3 (B) registrados al aplicar pulsos entre -130 y -30 mV desde un potencial de fijación de -30 mV. Los ajustes a una función exponencial para obtener la constante cinética de la activación ( $\tau_{act}$ ) se muestran superpuestos a los trazos de corriente. (C) Comparación de las  $\tau_{act}$  de los diferentes canales Kir2 a -115 mV. [Adaptadas de Panama y Lopatin, 2006]

Las subunidades Kir2 presentan también diferentes cinéticas de activación (Figura I.19). La apertura de los canales Kir cardiacos tras la hiperpolarización de la membrana se caracteriza por una fase casi instantánea (activación) seguida de una ligera caída de la corriente dependiente del tiempo producida por cationes extracelulares. La amplitud de ambas fases depende del tipo de canal y de las condiciones experimentales empleadas, pero, en general, la cinética de activación viene determinada principalmente por la cinética de disociación de las poliaminas (y, mayoritariamente, de la espermina) de su sitio de unión en el canal, además de depender en gran medida del  $E_m$  y de la  $[K^+]_e$ . La constante cinética de activación ( $\tau_{act}$ ) es similar en los canales Kir2.1 y Kir2.2 ( $\approx 0.5$ -2 ms), mientras que es  $\approx 7$ -9 veces mayor en los canales Kir2.3 (Figura I.19) (Panama y Lopatin, 2006; Panama y cols., 2007).

### 3.5.4. Composición de los canales que generan la $I_{K1}$

Como ya se ha mencionado, Gaborit y cols. describieron el año 2007 de forma detallada el patrón de la expresión de los diferentes miembros de la subfamilia Kir2 (excepto Kir2.4) en los distintos tejidos cardiacos humanos (Gaborit y cols., 2007). Estos autores encontraron diferencias significativas en el patrón de expresión entre el epicardio y el endocardio del lado derecho del corazón para las subunidades Kir2.1 (expresión más elevada en el endocardio derecho), para Kir2.2 (expresión más elevada en el epicardio derecho) y para Kir2.3 (expresión más elevada en el endocardio derecho) (Tabla I.4). Asimismo, se han encontrado diferencias en la expresión de las diferentes subunidades Kir2.x en las fibras de Purkinje (Kir2.1 ~ Kir2.3 > Kir2.2), en el ventrículo derecho (Kir2.1 > Kir2.2 ~ Kir2.3), en la aurícula

derecha (Kir2.3 > Kir2.2 > Kir2.1) y en la aurícula izquierda (Ki2.2>Kir2.3>Kir2.1) (Gaborit y cols., 2007) (Tabla I.4). Aunque estos resultados contradicen los que se habían obtenido en un estudio anterior (Wang y cols., 1998).

	AI (n=7)		VI (n=7)		EpiI (n=7)		EndoI (n=7)		AD (n=5)		VD (n=5)		EpiD (n=8)		EndoD (n=8)		FP (n=8)	
	media	EEM	media	EEM	media	EEM	media	EEM	media	EEM	media	EEM	media	EEM	media	EEM	media	EEM
<b>Kir2.1</b>	45.3	9.9	144.9	30.6	132.8	20.4	131.7	19.3	49.8	7.3	200.6	25.8	125.9	18.6	165.5	22.9	72.6	10.2
<b>Kir2.2</b>	304.1	37	177.7	29.7	187.9	38.6	163.2	43.2	116.5	25.3	125	21.6	83	5.4	61.4	7.8	46.8	6.6
<b>Kir2.3</b>	88	11.2	163.6	29.8	109.9	25.9	132.7	21.8	213.1	41.2	106.1	25.8	51.7	12.2	75.8	7	61.6	10.8

**Tabla I.4. Niveles de expresión de los canales Kir2.x en corazón humano.** A (aurícula); V (ventrículo); I (izquierdo); D (derecho); Epi (epicardio); Endo (endocardio); FP (fibras de Purkinje). Cada condición se expresa en media  $\pm$  EEM de la expresión relativa ( $2^{-\Delta C_t}$ ) obtenida para cada gen frente a HPRT (hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa) (x100). [Adaptada de Gaborit y cols., 2007]

Para averiguar la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  se han llevado a cabo diferentes aproximaciones, entre ellas, diferenciar la presencia de los distintos tipos de canales en función de su conductancia. En miocitos auriculares y ventriculares, se han registrado corrientes unitarias que presentaban conductancias que iban desde los  $\approx 10$ -15 pS (correspondientes a canales Kir2.3) hasta los  $\approx 40$ -45 pS (correspondientes a canales Kir2.2), pasando por conductancias intermedias ( $\approx 21$ -28 pS, correspondientes a canales Kir2.1) (Sakmann y Trube, 1984a; Matsuda, 1988; Burnashev y Zilberter, 1986; Wible y cols., 1995; Liu y cols., 2001). Sin embargo, la frecuencia con la que se detectan dichas conductancias depende de la especie y del tejido estudiado. El uso de oligonucleótidos antisentido (AsODN) contra el ARNm de Kir2.1 en miocitos ventriculares de rata produjo una drástica reducción de la  $I_{K1}$  (Nakamura y cols., 1998) lo que sugería que los canales Kir2.1 eran los mayoritarios. Posteriormente, Zaritsky y cols. ablacionaron los genes que codifican las proteínas Kir2.1 y Kir2.2 en ratones (ratones Kir2.1<sup>-/-</sup> y Kir2.2<sup>-/-</sup>, respectivamente) (Zaritsky y cols., 2000). Los miocitos ventriculares de los ratones Kir2.1<sup>-/-</sup> (que apenas sobrevivían unas horas tras el nacimiento) carecían de  $I_{K1}$ , demostrando que en esta especie también los canales Kir2.1 son esenciales para la generación de la  $I_{K1}$ . Por el contrario, los ratones Kir2.2<sup>-/-</sup> sí eran viables y presentaban  $I_{K1}$ , aunque ésta era menor a la registrada en miocitos de animales normales (Zaritsky y cols., 2000), lo que sugería que estos canales también participaban en la  $I_{K1}$ .

También se ha tratado de averiguar la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  atendiendo a las diferencias que presentan cada uno de los miembros de la subfamilia Kir2 respecto a propiedades como la sensibilidad al Ba<sup>2+</sup>, al pH o la cinética de activación (Tabla

I.3). Schram y cols. han demostrado que la sensibilidad al  $\text{Ba}^{2+}$  de los canales Kir2.1+Kir2.3 es mayor a la que presentan cada uno de ellos por separado y similar a la que presentan los canales Kir2.2, pero diferente a la que presenta la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares humanos, lo que confirma la participación de varias subunidades Kir2.x diferentes en la generación de la  $I_{K1}$  humana (Schram y cols., 2003).

Como se ha mencionado, los canales Kir2.x también se diferencian en su cinética activación (Figura I.19). Analizando la cinética de activación de la  $I_{K1}$  registrada en miocitos de ratón y de cobayo se ha sugerido que la participación de los canales Kir2.3 en la corriente en dichos animales es minoritaria (Yan y cols., 2005; Panama y cols., 2007). Por el contrario, el estudio de la sensibilidad al pH de la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares de oveja ha demostrado una gran contribución de los canales Kir2.3 a la génesis de la  $I_{K1}$  en dichos miocitos (Tabla I.3) (Muñoz y cols., 2007).

### 3.5.5. Regulación de la $I_{K1}$

- Modulación por cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ )

En experimentos de fijación de voltaje se ha observado que la amplitud de la  $I_{K1}$  disminuye tras la aplicación mantenida de un pulso hiperpolarizante (Maughan, 1976; Baumgarten y cols., 1977; Sakmann y Trube, 1984b), disminución que es debida a la inhibición dependiente de voltaje producido por cationes extracelulares (Biermans y cols., 1987), siendo el  $\text{Na}^+$  el principal ion implicado en dicho proceso en los músculos cardíaco y esquelético (Standen y Stanfield, 1979). En miocitos ventriculares de cobayo, la eliminación de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  del medio extracelular hace desaparecer de forma casi completa la reducción de la  $I_{K1}$  dependiente del tiempo (Sakmann y Trube, 1984b; Shieh, 2000). Efectivamente, el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular son bloqueantes débiles de los canales Kir2.x.

El  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular produce una inhibición dependiente de voltaje de la  $I_{K1}$  (Matsuda y Cruz, 1993). Aunque el  $\text{Ca}^{2+}$  es un inhibidor menos potente que el  $\text{Mg}^{2+}$  y sus concentraciones intracelulares medias son bastante bajas, hay bastantes evidencias de que las  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pueden tener efectos dinámicos sobre la  $I_{K1}$ . Por ejemplo, los aumentos transitorios de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que tienen lugar durante el PA producen la inhibición de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de cobayo (Zaza y cols., 1998). Estos resultados sugieren que los canales que generan la  $I_{K1}$  se

localizan en espacios como los túbulos T, regiones restringidas y próximas a los lugares en los que se produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo.

La unión del  $\text{Mg}^{2+}$  intracelular al canal depende del  $E_m$ , por lo que la velocidad de repolarización de la membrana afecta a las cinéticas de asociación/disociación de este ion y, por tanto, a la amplitud de la  $I_{K1}$ . De hecho, se ha descrito que la amplitud de la  $I_{K1}$  de salida depende en gran medida de la velocidad con la que se repolariza la membrana (Ishihara, 1997; Ishihara y Ehara, 1998).

Los iones  $\text{Ba}^{2+}$  son los cationes divalentes que con mayor potencia inhiben de la  $I_{K1}$  (DiFrancesco y cols., 1984) y, de hecho, la inhibición producido por el  $\text{Ba}^{2+}$  extracelular se considera una de las características que definen a las corrientes rectificadoras internas, por lo que ha sido ampliamente utilizado para caracterizar los nuevos canales clonados como miembros de la familia Kir. Como se ha mencionado, cada una de las subunidades Kir2 posee diferente sensibilidad al  $\text{Ba}^{2+}$  (Liu y cols., 2001; Preisig-Müller y cols., 2002; Schram y cols., 2003).

- Estimulación adrenérgica

En general, está ampliamente aceptado que tanto la estimulación adrenérgica  $\alpha$  (Fedida y cols., 1991; Braun y cols., 1992) como la  $\beta$  (Koumi y cols., 1995b) producen una reducción de la  $I_{K1}$ , aunque también hay resultados en sentido contrario (Gorostiza y cols., 1995). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se han centrado en el estudio de la corriente de entrada de la  $I_{K1}$ , sin prácticamente atender a los efectos sobre la corriente de salida, que es la realmente relevante a nivel fisiológico. Un estudio en miocitos ventriculares de cobayo ha demostrado que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica produce una reducción significativa de la corriente de entrada, causando una mínima (casi nula) inhibición de la corriente de salida (Koumi y cols., 1995b). A esta disparidad de resultados contribuye también la coexistencia de diferentes tipos de receptores adrenérgicos en el corazón. Por ejemplo, se ha demostrado que la estimulación de receptores  $\beta_1$  produce la disminución de la  $I_{K1}$ , mientras que la estimulación de receptores  $\beta_3$  produce el aumento de las corrientes generadas por los canales Kir2.1 (mediado por la proteína cinasa C –PKC-) y Kir2.2 (mediado por la proteína cinasa A –PKA-), aunque no de la generada por los canales Kir2.3 (Scherer y cols., 2007), y la estimulación de receptores  $\alpha_{1A}$  produce la inhibición de las corrientes generadas por los canales Kir2.2 y Kir2.3, pero no de la generada por los canales Kir2.1 (Zitron y cols., 2008).

- Modulación por poliaminas

Las concentraciones celulares de poliaminas se regulan por un complejo sistema de enzimas (Seiler, 1994) dando lugar a niveles de poliaminas libres que son suficientes para producir la rectificación interna de los canales Kir descrita anteriormente. La concentración citoplásmica de cada poliamina está regulada para que cada una de ellas juegue un papel específico en la función de los canales (Lopatin y cols., 1995), por lo que sus niveles se ajustan de forma dinámica para producir la rectificación en el rango fisiológico en el que se mueven los potenciales de membrana.

Experimentalmente, se ha demostrado que la manipulación de las concentraciones de poliaminas pueden modular las corrientes generadas por canales Kir2 (Bianchi y cols., 1996; Shyng y cols., 1996; Lopatin y cols., 2000). Por ejemplo, Bianchi y cols. (1996) han demostrado en basófilos de rata que la rectificación interna se atenuaba tras un tratamiento con un inhibidor específico de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC), ya que este inhibidor producía el aumento de las concentraciones de putrescina y la disminución de las concentraciones de espermidina y espermina (Bianchi y cols., 1996). Asimismo, ratones transgénicos en los que se elimina el gen de la espermina sintasa presentaban unos niveles indetectables de espermina y un aumento de 5 veces en los niveles de espermidina, lo que se traducía en una  $I_{K1}$  con una menor rectificación y cinéticas de activación más rápidas (Lopatin y cols., 2000). Por otro lado, la sobreexpresión de la ornitina descarboxilasa (ODC) en corazones de ratón, a pesar de que producía un aumento de los niveles intracelulares de putrescina de más del 35%, apenas ocasionaba un ligero aumento de la amplitud de la  $I_{K1}$ , lo que sugiere que la putrescina juega un papel poco importante en la regulación de la  $I_{K1}$  (Lopatin y cols., 2000). Por el contrario, se ha demostrado que la eliminación de la putrescina intracelular sí afecta a la rectificación de los canales Kir2.3 (Shyng y cols., 1996), mientras que la eliminación de la putrescina del medio extracelular lleva a la depleción de sus niveles intracelulares, así como de los de espermidina y espermina, produciendo también modificaciones en las características cinéticas de Kir2.3 (Lopatin y cols., 1995).

- Modulación por pH

La sensibilidad de la  $I_{K1}$  al pH depende del tejido y de la especie estudiada, posiblemente debido a la diferente composición de los canales que la generan (Tabla I.3). En miocitos ventriculares de rata y cobayo, la  $I_{K1}$  es insensible a la  $[H^+]_i$  (Ito y cols., 1992; Komukai y cols., 2002a y 2002b), mientras que la  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares de oveja sí es



inhibida por la  $[H^+]_i$  que se encuentran en el rango fisiológico (Muñoz y cols., 2007). Dado que los canales Kir2.3 son más sensibles a la  $[H^+]_i$  que los Kir2.1 y Kir2.2 (Tabla I.3) (Yan y cols., 2005), estos resultados son consistentes con la importante contribución de los canales Kir2.3 a la  $I_{K1}$  en estos miocitos (Dhamoon y cols., 2004). De hecho, se ha descrito que son las subunidades Kir2.3 las que confieren sensibilidad al pH a los heterotetrámeros Kir2.1+Kir2.3 (Muñoz y cols., 2007), siendo la treonina en posición 53 el residuo responsable de la sensibilidad al pH en los canales Kir2.3 (Qu y cols., 2000).

Los canales Kir1.1 (homólogos de Kir2.1, pero con una rectificación interna más débil) son sensibles a las  $[H^+]_i$  que se encuentran en el rango fisiológico (Tsai y cols., 1995). La gran sensibilidad del canal Kir1.1 a los cambios en el pH está relacionada con la presencia de una lisina en la posición 80 (Fakler y cols., 1996b), ya que la neutralización de este residuo resulta en la pérdida de sensibilidad al pH intracelular. Por su parte, la sustitución del residuo homólogo en el canal Kir2.1 por una lisina (M84K) hace que este canal adquiera sensibilidad al pH intracelular (Fakler y cols., 1996b). Además, los canales que se forman tras el ensamblaje de subunidades Kir2.1 con otros miembros de la familia Kir2 sensibles al pH (p.e., Kir2.3) sí que presenten sensibilidad al pH (Muñoz y cols., 2007).

- Modulación por  $PIP_2$

El  $PIP_2$  es un importante segundo mensajero de una gran variedad de vías de señalización (Hilgemann, 1997; Hilgemann y cols., 2001). La primera corriente con rectificación interna de la que se describió su modulación por el  $PIP_2$  fue la  $I_{K,ATP}$  (Hilgemann y Ball, 1996) y, desde entonces, se ha descrito que el  $PIP_2$  es capaz de modular todos los canales Kir tanto en células nativas como en sistemas de expresión heterólogos (Logothetis y cols., 2007; Lopes y cols., 2007).

El  $PIP_2$  produce la apertura de los canales Kir, mientras que su eliminación produce el cierre de los mismos (Huang y cols., 1998; Shyng y cols., 2000; Lopes y cols., 2002; Rohacs y cols., 2003; Logothetis y cols., 2007; Hansen y cols., 2011). En este sentido, Rohacs y cols. (1999) demostraron que el  $PIP_2$  es un potente activador de los canales Kir2.1, mientras que su modulación de otros canales Kir (como los canales Kir3.1 o Kir3.4) es más débil (Rohacs y cols., 1999). Además, se ha demostrado la importancia de la localización de los dos grupos fosfato en las posiciones 4 y 5 de la molécula de  $PIP_2$ , ya que el cambio de posición o la eliminación de estos sustituyentes disminuye la afinidad de estos compuestos por los canales Kir2.1 (Rohacs y cols., 1999). El  $PIP_2$  también afecta a las propiedades de los miembros de la

subfamilia Kir2. Por ejemplo, se ha demostrado que la modulación de los canales Kir2.3 por el pH, la ACh o el miristato-acetato de forbol (PMA, *Phorbol Myristate Acetate*) depende de las interacciones entre el PIP<sub>2</sub> y el canal (Logothetis y cols., 2007).

Se han identificado numerosos residuos implicados en la modulación de los canales Kir2 por el PIP<sub>2</sub>, aunque la mayoría de ellos se localizan en la parte superior del dominio citoplásmico (la más próxima a la cara interna de la membrana plasmática) y en la *slide helix* (Lopes y cols., 2002; Decher y cols., 2007; Logothetis y cols., 2007). Por ello, se ha propuesto que el PIP<sub>2</sub> modula los canales Kir interaccionando con los extremos N- y C-terminales de los canales, aproximando el dominio intracelular a la cara citoplásmica de la membrana y “forzando” de esta manera la apertura del canal (Logothetis y cols., 2007). Las interacciones entre el PIP<sub>2</sub> y el canal Kir2.1 producen un aumento de la probabilidad de apertura del canal, favoreciendo la estabilización del mismo en el estado abierto y facilitando las transiciones desde el estado cerrado hacia el abierto (Xie y cols., 2008). En 2011, Hansen y cols. demostraron mediante cristalografía de rayos X que el PIP<sub>2</sub> se une a la interfase entre el dominio TM y el dominio citoplasmático de Kir2.2 permitiendo un cambio conformacional en el canal que pasa del estado cerrado al abierto (Hansen y cols., 2011). El estudio demostraba que eran indispensables para la unión a las cadenas acilo y al fosfato en posición 1' del PIP<sub>2</sub> los aminoácidos R78, W79 y R80 (posiciones en Kir2.2) situados en el dominio TM. Por su parte, los aminoácidos K183, R186, K188 y K189 (posiciones en Kir2.2) situados en el dominio citoplasmático jugarían un papel fundamental en la unión a los fosfatos del PIP<sub>2</sub> en posiciones 4' y 5'.

- Determinantes moleculares del tráfico, expresión en membrana y densidad de la corriente de los canales Kir2.x

Se han identificado numerosos residuos implicados en la modulación del tráfico, la expresión en membrana y la corriente de los canales Kir2.x. Alineando las secuencias de Kir2.1, 2.2 y 2.3 se pueden diferenciar que las principales secuencias de regulación se encuentran en los extremos N y C-terminales de las 3 subunidades (Figura I.20).

La secuencia FCYENE correspondiente a las posiciones 374-379 de Kir2.1 es fundamental para que se produzca la salida del canal del retículo endoplásmico (RE), de hecho, mutaciones en esta región disminuyen la expresión en membrana de los canales Kir2.x (Figura I.20) (Ma y cols., 2001). Por otro lado, tanto la secuencia RxR correspondiente a los aminoácidos 44 y 46 de Kir2.1, como SSYLANE (posiciones 313-319 en Kir2.1) conforman

una señal de salida del Golgi cuando se unen el extremo N y C-terminal y forman una estructura terciaria que cuando está intacta permite que el canal supere los controles de calidad (Ma y cols., 2011) (Figura I.20). Como comentamos, sólo en la posición 311 de Kir2.1 se encuentra una cisteína (en Kir2.2 y Kir2.3 se encuentra una alanina), lo que le confiere sensibilidad a la flecainida y propafenona que, a concentraciones incluso por debajo de las alcanzadas tras administrar dosis terapéuticas aumentan la  $I_{\text{Kir2.1}}$  (Caballero y cols., 2010a; Gómez y cols., 2014) (Figura I.20). Por último en el extremo C-terminal (posiciones 422-427 en Kir2.1) se encuentran solapadas una secuencia de fosforilación por PKA (RRES) y una secuencia de unión a dominios PDZ (SEI, SAI), siendo la fosforilación y defosforilación de esta serina fundamental para la unión a las proteínas con dominios PDZ como SAP97 y  $\alpha$ -1-sintrofina (Leonoudakis y cols., 2001; 2004a; 2004b; Vaidyanathan y cols., 2010).



**Figura 1.20. Alineamiento de secuencia de los canales Kir2.x humanos.** En rosa se indica cuando las secuencias son idénticas o muy parecidas. Recuadrada en negro secuencia de salida del RE. Recuadrada en rojo y en verde señales de salida del aparato de Golgi. Recuadrada en azul Cys311 en Kir2.1 responsable de la unión a flecaínida y propafenona. Recuadrada en púrpura secuencia de fosforilación para PKA (RRES) y secuencia de unión a dominios PDZ (SEI, SAI).

### 3.5.6. La $I_{K1}$ en diversas patologías

Tanto la  $I_{K1}$  auricular como los niveles de ARNm de Kir2.1 están aumentados en pacientes con FA crónica (Van Wagoner y cols., 1997; Bosch y cols., 1999; Dobrev y cols., 2001 y 2002; Gaborit y cols., 2005 y 2007; Nattel y cols., 2008 y 2010; González de la Fuente y cols., 2013). El aumento de la corriente contribuye en gran medida al acortamiento de la DPA, así como al mantenimiento y perpetuación de la arritmia (Dhammon y Jalife, 2005). En muestras de pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva (ICC), se han descrito efectos

diferentes en la  $I_{K1}$  de miocitos ventriculares y de miocitos auriculares. Concretamente, en los miocitos ventriculares humanos, se ha descrito una disminución significativa de la  $I_{K1}$  (Beuckelmann y cols., 1993), al igual que en conejo (Pogwizd y cols., 2001) y en rata (Fauconnier y cols., 2005). Por el contrario, en los miocitos auriculares humanos, se ha descrito una disminución de la  $I_{K1}$  (Koumi y cols., 1994).

Muchos estudios han demostrado que la  $I_{K1}$ , al igual que otras corrientes de  $K^+$ , disminuye en ratas espontáneamente hipertensas y en modelos animales de hipertrofia cardiaca (Brooksby y cols., 1993; McIntosh y cols., 1998; Näbauer y Kääb, 1998; Mitarai y cols., 2000). A este respecto, es importante resaltar que numerosos trabajos han demostrado que la hipertrofia cardiaca aumenta las concentraciones de poliaminas (Caldarera y cols., 1974; Bartolome y cols., 1980), por lo que es probable que la reducción de la  $I_{K1}$  sea consecuencia de dicho aumento. Sin embargo, en un modelo felino de hipertrofia ventricular, la  $I_{K1}$  aumenta en los miocitos del ventrículo derecho (Kleiman y Houser, 1989), mientras que no se modifica en los del ventrículo izquierdo (Furukawa y cols., 1993).

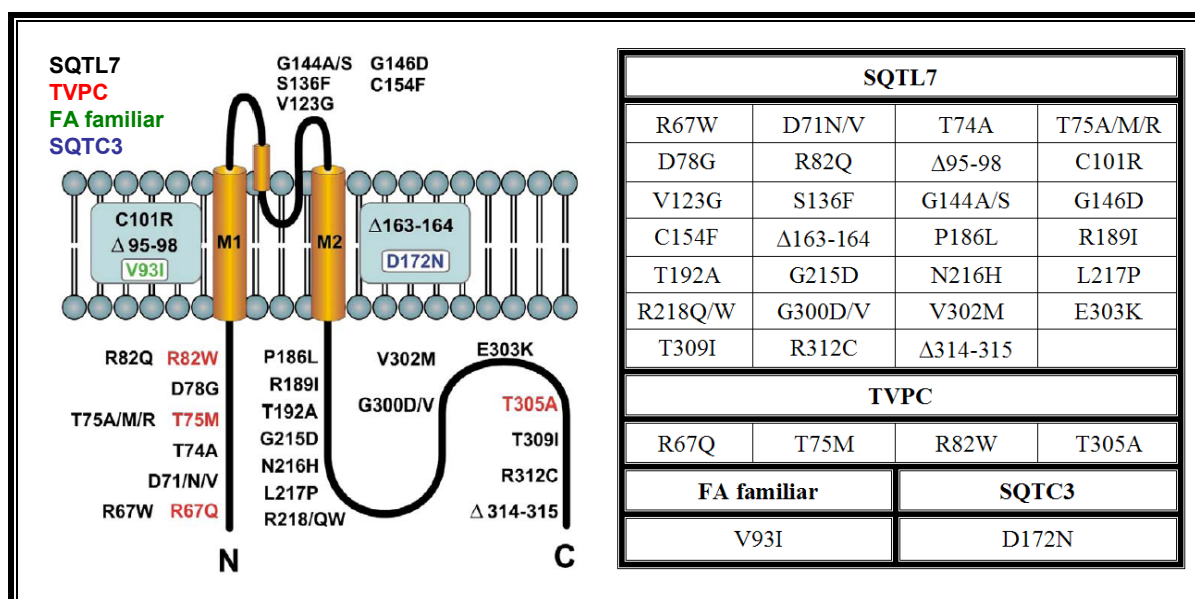
Los miocitos ventriculares humanos de regiones que sufren isquemia crónica presentan un PR más despolarizado y una DPA prolongada, especialmente en la fase final de la repolarización (Mubagwa y cols., 1994), lo que concuerda con la reducción de la  $I_{K1}$  que se produce tras un infarto de miocardio (Lue y Boyden, 1992; Beuckelmann y cols., 1993; Pinto y Boyden, 1998). Durante el estrés metabólico (p.e., durante la isquemia), el marcado aumento de la  $I_{K,ATP}$  enmascara muchos de los efectos que ocurren en otras corrientes de  $K^+$  como la  $I_{K1}$ . Sin embargo, utilizando glibenclamida como inhibidor de la  $I_{K,ATP}$ , Xie y cols. lograron demostrar que la iodacetamida, un inductor de estrés metabólico, inhibe la  $I_{K1}$  (Xie y cols., 1997). Además, la inhibición inducida por  $Ba^{2+}$  de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de conejo elimina la protección frente al estrés metabólico que produce el preconditionamiento isquémico, un papel que clásicamente se había asignado a la  $I_{K,ATP}$  (Díaz y cols., 2004). Por último, diversos estudios sugieren que la  $I_{K1}$  aumenta en condiciones de hipoxia/anoxia (Ruíz-Perich y cols., 1991) o en presencia de cianida (Muramatsu y cols., 1990). De hecho, se ha demostrado que el acortamiento de la DPA que se produce en la fase aguda de la hipoxia está mediado por la  $I_{K1}$  y no por la  $I_{K,ATP}$  (Piao y cols., 2007a).

Por último, es importante resaltar que la modulación de la relación I-V por la  $[K^+]_e$  no sólo es una característica biofísica sino que tiene implicaciones fisiopatológicas, ya que la  $[K^+]_e$  se eleva durante los episodios isquémicos o en presencia de taquiarritmias como

resultado de una acumulación de iones  $K^+$  en los espacios intercelulares y en las proximidades de los túbulos T (Sejersted y Sjøgaard, 2000).

### Canalopatías asociadas a los canales Kir2.1

Hasta la fecha, se han descrito 4 tipos de síndromes arritmogénicos primarios [el síndrome de Andersen-Tawil (SAT) o también conocido como síndrome de QT largo tipo 7 -SQTL7-, el síndrome de QT corto tipo 3 (SQTC3), la taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas (TVPC) y la FA familiar] asociados a mutaciones que producen la pérdida o la ganancia de función de los canales Kir (Figura I.21). Curiosamente sólo se han identificado arritmias familiares secundarias a mutaciones en el gen que codifica las subunidades Kir2.1 (*KCNJ2*) y no en los genes que codifican los canales Kir2.2 o Kir2.3.



**Figura I.21. Mutaciones en la subunidad Kir2.1 asociadas con canalopatías.** En el dibujo, las diferentes mutaciones siguen el siguiente código de color: negro para el SQTL7, rojo para el TVPC, verde para la FA familiar y azul para el SQTC3. [Adaptada de Anumonwo y Lopatin, 2010]

#### • SAT

El SAT es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por parálisis periódicas y diferentes alteraciones multiorgánicas entre las que se encuentran la escoliosis, el paladar hendido, baja estatura y la debilidad muscular (Plaster y cols., 2001; Donaldson y cols., 2003; Terzic y cols., 2008). Las alteraciones en la actividad eléctrica cardíaca incluyen la prolongación del intervalo QT del ECG (por eso se conoce también como SQTL tipo 7),

rachas de taquicardia ventricular y la aparición de múltiples focos ectópicos ventriculares tras la estimulación adrenérgica. Sin embargo, Zhang y cols. (2005b) han sugerido que la clasificación del SAT como SQT<sub>L</sub>7 podría no ser del todo correcta, ya que las modificaciones en el ECG características del SAT están más relacionadas con alteraciones del complejo T-U (Zhang y cols., 2005b). Un amplio estudio genético permitió relacionar el SAT con el brazo largo del cromosoma 17, precisamente donde se localiza el *locus* del gen *KCNJ2* (Kir2.1), por lo que se buscaron posibles mutaciones en este gen. Este estudio demostró que más de la mitad de los pacientes con SAT presentaban mutaciones en el gen *KCNJ2* (Plaster y cols., 2001), por lo que se denomina como tipo 1 (SAT1) cuando están afectados los canales Kir2.1 (Plaster y cols., 2001; Andelfinger y cols., 2002; Schulze-Bahr, 2005; Zhang y cols., 2005b).

Se han identificado más de 33 mutaciones en el gen *KCNJ2* relacionadas con el SAT1 (Figura I.21), todas ellas caracterizadas por la pérdida de función del canal Kir2.1, lo que origina la prolongación del intervalo QT y predispone al paciente a sufrir arritmias cardíacas. Debido a que el SAT1 es un trastorno autosómico dominante (un alelo mutado y otro sano), Plaster y cols. (2001) estudiaron en oocitos de *Xenopus* los efectos de coexpresar las subunidades mutadas y las WT para dos de estas mutaciones (D71V y R218Q), demostrando que las subunidades mutadas tenían un efecto dominante negativo por lo que los canales que contenían la subunidad mutada no eran funcionales (Plaster y cols., 2001). Además, la pérdida de función de los canales producida por la mutación en la mayor parte de los casos es debida a que disminuye la interacción del canal mutado con el PIP<sub>2</sub> (Plaster y cols., 2001; Lopes y cols., 2002; Pegan y cols., 2006; Terzic y cols., 2008). Es el caso de las mutaciones R218Q y R218W (Plaster y cols., 2001; Lopes y cols., 2002). Estos residuos ocupan las posiciones equivalentes a los identificados mediante difracción de rayos X como responsables de la interacción con el PIP<sub>2</sub> en canales Kir2.2 cristalizados (Hansen y cols., 2011).

#### • SQT<sub>C</sub>

En el año 2005, Priori y cols. describieron la tercera variante del SQT<sub>C</sub> (SQT<sub>C</sub>3), relacionada con una mutación en el gen *KCNJ2* (Priori y cols., 2005). Esta mutación produce una ganancia de función en los canales Kir2.1, por lo que se traduce en un aumento en el flujo de salida de K<sup>+</sup> y, en consecuencia, en una aceleración de la repolarización.

El SQT<sub>C</sub>3 se caracteriza por la aparición de ondas T asimétricas en el ECG (Priori y cols., 2005). El análisis genético de los miembros de una familia con SQT<sub>C</sub>3 permitió la identificación de una mutación en el gen *KCNJ2* en la que se produce la sustitución de un

ácido aspártico por una asparragina en la posición 172 (D172N) de la subunidad Kir2.1 (Priori y cols., 2005). Este ácido aspártico es un aminoácido altamente conservado dentro de la familia Kir2 y, como se ha mencionado, juega un papel crítico en la rectificación de estos canales (Lu y MacKinnon, 1994; Stanfield y cols., 1994; Yang y cols., 1995a). La coexpresión del canal mutado con el WT en sistemas de expresión heterólogos genera una corriente significativamente mayor a la generada por homotetrámeros de canales WT. Además, mediante simulaciones por ordenador se demostró que el aumento de la corriente de salida de  $K^+$  causado por la mutación podía explicar el aumento y la asimetría de las ondas T del ECG que presentaban los pacientes (Priori y cols., 2005). Por último, aunque no se podían realizar estudios de susceptibilidad a las arritmias en estos pacientes, las simulaciones por ordenador predecían que las mutaciones causantes del SQTC3 predisponían a estos pacientes a un mayor riesgo de sufrir arritmias por reentrada (Priori y cols., 2005).

En los últimos años se han descrito nuevas mutaciones en *KCNJ2* como por ejemplo M301K y E299V asociadas a SQTC3, aunque el mecanismo que lleva al acortamiento del QT parece diferir respecto a D172N. Mientras esta última mutación incrementa la corriente de salida sin modificar las propiedades rectificadoras del canal, las mutaciones M301K y E299V aumentan la corriente por disminuir la rectificación del canal (Hattori y cols., 2012; Deo y cols., 2013). Es decir, un mecanismo similar al producido por la flecainida, la propafenona, y otros fármacos con una estructura similar a la del farmacóforo de los fármacos capaces de unirse a la Cys311. Por eso, se ha propuesto que todos estos fármacos tienen un potencial proarrítmico importante que debería evaluarse (Caballero y cols., 2010a; Gómez y cols., 2014). Es más, la capacidad de aumentar la  $I_{K1}$  como consecuencia de la disminución de la rectificación sería responsable del alto potencial proarrítmico ventricular de fármacos como la flecainida y la propafenona.

- FA familiar

Estudios previos en pacientes con FA ya habían relacionado esta enfermedad con mutaciones en los genes *KCNQ1* (Chen y cols., 2003b) y *KCNE2* (Yang y cols., 2004). Xia y cols. (2005) identificaron una mutación relacionada con la FA familiar en el gen *KCNJ2*. En este caso, la sustitución de una valina por una isoleucina en la posición 93 (p.V93I) produce un aumento de la  $I_{K1}$  por un mecanismo no identificado por los autores (Xia y cols., 2005). Lo que no se ha explicado es el porqué estos pacientes no presentaban arritmias a nivel ventricular y un intervalo QT breve.



- Taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas (TVPC)

La TVPC es una arritmia hereditaria en la que los pacientes presentan arritmias ventriculares y muerte súbita asociadas al ejercicio físico y a la estimulación adrenérgica (Leenhardt y cols., 1995; Tester y cols., 2006). Se han descrito varios tipos de TVPC asociados con problemas en el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  en los que están implicados los canales RyR (TVPC tipo 1) (Priori y cols., 2002) o la calsecuestrina (TVPC tipo 2) (Postma y cols., 2002). En un estudio genético realizado en una cohorte de 541 pacientes con TVPC, se identificaron cuatro mutaciones en el gen *KCNJ2* (R67Q, T75M, R85W y T305A) que producían la pérdida de función de los canales Kir2.1. En el momento actual se desconoce que relación presentan los aminoácidos mutados con los efectos de la estimulación adrenérgica del canal Kir2.1 (Eckhardt y cols., 2007). El ECG de los pacientes con estas mutaciones presentaba ondas U prominentes, actividad ectópica ventricular y rachas de taquicardia ventricular polimórfica. Sin embargo, no sufrían alteraciones musculares esqueléticas (Eckhardt y cols., 2007) o dismórficas similares a las que presentan los pacientes con SAT. Cuando los mutantes se expresaban en sistemas heterólogos, la amplitud de la corriente disminuía un 95% con respecto a la generada por canales WT. Más aún, los canales R67Q y T75M producían efecto dominante negativo cuando se coexpresaban con los canales WT.

#### 4. CANALES DE $\text{Na}^+$

Los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje son proteínas TM fundamentales en la génesis y propagación de la señal eléctrica en tejidos excitables como el corazón, el músculo esquelético o el sistema nervioso (Hodgkin y Huxley, 1952a y 1952b; Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; George, 2005). La  $I_{\text{Na}}$  cardíaca es responsable de la despolarización (fase 0) de los PAs  $\text{Na}^+$ -dependientes y, por tanto, de la excitabilidad y la velocidad de conducción cardíacas. Además, participa en el control de la fase de meseta (fase 2) y, por tanto, de la DPA y de la refractariedad cardíacas (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985).

##### 4.1. Estructura de los canales de $\text{Na}^+$

Los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje están compuestos por una subunidad conductora  $\alpha$  (de la que se han caracterizado 9 isoformas) y una o varias subunidades accesorias  $\beta$  ( $\beta_1$  a  $\beta_4$ ) (Figura I.22 y Tabla I.5) (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Catterall, 2012).

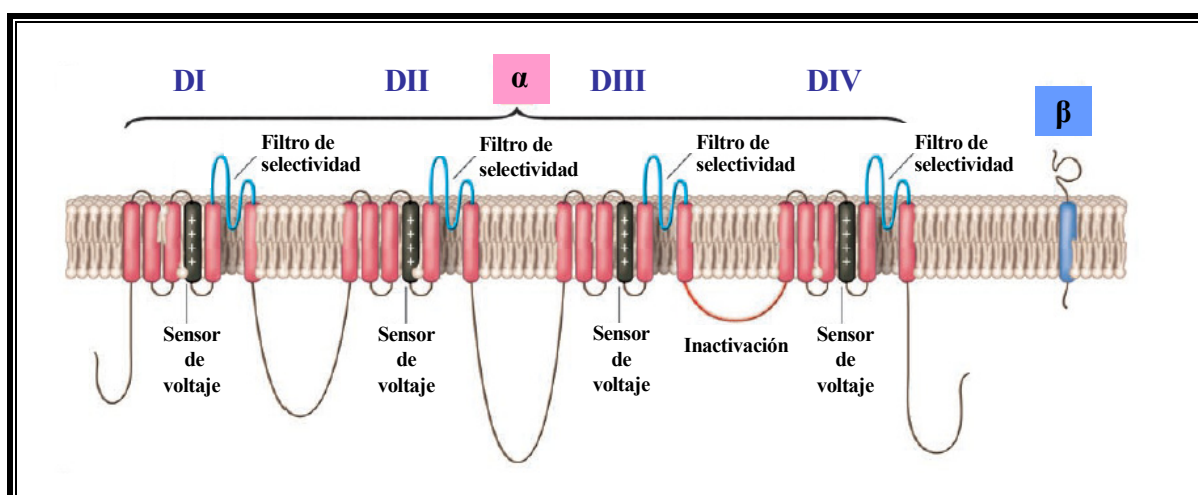
- Subunidad  $\alpha$

Las subunidades  $\alpha$  de los canales de  $\text{Na}^+$  pertenecen a una pequeña familia de proteínas con una secuencia de aminoácidos altamente conservada que se expresan en diferentes tejidos y cuyas propiedades no son idénticas (Goldin, 2002).

Subunidad $\alpha$				Subunidad $\beta$			
Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido	Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido
<i>SCN1A</i>	Nav1.1* ( $\alpha_1$ )	2q24	SNC	<i>SCN1B</i>	Nav $\beta$ 1.1* ( $\beta_1$ )	19q11	SNC
<i>SCN2A</i>	Nav1.2 ( $\alpha_2$ )	2q23	SNC	<i>SCN2B</i>	Nav $\beta$ 2.1* ( $\beta_2$ )	11q24	SNC
<i>SCN3A</i>	Nav1.3* ( $\alpha_3$ )	2q24	SNC	<i>SCN3B</i>	Nav $\beta$ 3.1* ( $\beta_3$ )	11q26	SNC
<i>SCN4A</i>	Nav1.4* ( $\alpha_4$ )	17q21	ME	<i>SCN4B</i>	Nav $\beta$ 4.1 ( $\beta_4$ )	11q24	SNC
<i>SCN5A</i>	Nav1.5* ( $\alpha_5$ )	3p21	MC				
<i>SCN8A</i>	Nav1.6* ( $\alpha_8$ )	2q13	SNC				
<i>SCN9A</i>	Nav1.7	2q24	T				
<i>SCN10A</i>	Nav1.8*	3p22	SNP				
<i>SCN11A</i>	Nav1.9	3p21	SNC				

**Tabla I.5. Subunidades que forman el canal de  $\text{Na}^+$  dependiente de voltaje en el hombre.** \*Subunidades que se expresan en el corazón, siendo Nav1.5 la isoforma predominante en el corazón. MC: Músculo cardíaco. ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico. T: Tiroides. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

El gen *SCN5A* localizado en el cromosoma 3p21 codifica la subunidad  $\alpha$  Nav1.5, responsable de la  $I_{Na}$  cardiaca. Esta subunidad, de unos 227 kDa de peso molecular, está formada por 4 dominios homólogos (DI a DIV), con 6 segmentos TM dispuestos en  $\alpha$ -hélice cada uno (S1 a S6). ). Los dominios se conectan entre si mediante tres secuencias hidrofílicas no conservadas, denominadas “*interdomain linker loops*” (ID I, II, y III). El lazo que une los segmentos S5 y S6, denominado “lazo P”, es extracelular, determina la selectividad iónica y forma parte del poro (Poet y cols., 2001). Los extremos amino- y carboxilo-terminal (N- y C-terminal, respectivamente) y los lazos de unión entre los diferentes dominios son intracelulares (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Yu y Catterall, 2003; George, 2005) (Figura I.22). Se ha descrito que la subunidad Nav1.5 no es la única isoforma cuyo ARNm se expresa en el corazón (Nerbonne y Kass, 2005), e incluso algunas como Nav1.4 y Nav1.8 parecen estar implicadas en la regulación de la  $I_{Na}$  cardiaca (Hu y cols., 2014; Bissay y cols., 2016).



**Figura I.22. Estructura del canal de  $Na^+$ .** Esquema de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal de  $Na^+$ . En la subunidad  $\alpha$ , se indica el sensor de voltaje, el filtro de selectividad y los diferentes dominios (DI a DIV). [Adaptada de George, 2005].

Por lo que respecta a la estructura terciaria, clásicamente, se ha considerado que los S5 y los S6, junto a los lazos P, estarían orientados hacia el interior, formando las paredes del poro. La mayor parte de los residuos que forman los S5 y S6 de los 4 dominios son hidrófobos. Por su parte, los S4 presentan un residuo cargado (arginina o lisina) cada tres aminoácidos, formando una hélice de cargas positivas en la membrana. En total, hay 22 aminoácidos cargados positivamente (cuatro cargas positivas en el DI, cinco en los DII y DIII y ocho en el DIV) que aparecen conservados en todas las isoformas del canal de  $Na^+$  y que actúan como “sensor de voltaje” (Stühmer y cols., 1989). Los modelos estructurales consideran que los S4 se encuentran rodeados por el resto de los segmentos TM. La teoría más aceptada acerca del

movimiento del sensor de voltaje es que los S4 se mueven físicamente a través de la membrana desde el interior hacia el exterior en respuesta a la despolarización, exponiendo al exterior dos cargas positivas que se encontraban previamente “enterradas” en el interior de la membrana (Yang y cols., 1996; Bezanilla, 2000 y 2002).

Cuatro de los residuos presentes en los lazos P forman un anillo que se denomina “locus DEKA”: ácido aspártico en DI, ácido glutámico en DII, lisina en DIII y alanina en DIV (Figura I.22). Esta estructura determina la conductancia y la selectividad iónica del canal al  $\text{Na}^+$ , así como la unión de toxinas (Noda y cols., 1989; Terlau y cols., 1991). La sustitución de estos cuatro aminoácidos por residuos de ácido glutámico (que son los aminoácidos presentes en las posiciones análogas en el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ ) convierte los canales de  $\text{Na}^+$  en selectivos para el  $\text{Ca}^{2+}$  (Heinemann y cols., 1992).

La región C-terminal intracelular del canal Nav1.5 (los 243 últimos aminoácidos) contiene varios dominios importantes de interacción con proteínas, de los cuales los mejor caracterizados son el dominio IQ de unión a CaM, un dominio PY y un dominio de unión a PDZ (Shy y cols., 2013).

Los PDZ son dominios conservados, identificados en numerosas proteínas cuya función es generalmente de anclaje y estabilización en membrana. El canal Nav1.5 tiene definidos dos dominios de unión a PDZ: en el C-terminal (SIV) y en el N-terminal (SLA), fundamentales entre otros para la unión del canal a  $\alpha$ -1-sintrofina (Matamoros y cols., 2016).

Varios canales iónicos se regulan mediante ubiquitinación, una modificación postraducciona que produce la degradación o reciclaje de las proteínas diana (ver apartado I.4.3.5). Proteínas con una secuencia consenso [L/P]PxY (conocido como dominio PY) se unen específicamente a proteínas de la familia Nedd4. Dicho dominio está en el C-terminal de casi todos los canales de sodio dependientes de voltaje, menos en Nav1.4, Nav1.9 y  $\text{Na}_x$  (Shy y cols., 2013).

El dominio IQ con la secuencia consenso IQxxxRxxxxR presente en el dominio C-terminal del canal Nav1.5 es un dominio de unión a CaM. La CaM (ver apartado I.4.4) es una proteína ácida con cuatro sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad. Aunque se ha demostrado la interacción directa de CaM con el dominio IQ de Nav1.5, las consecuencias de esta interacción muestran resultados contradictorios (aumento o disminución de la corriente, modulación de la inactivación) (Deschenes y cols., 2002; Tan y cols., 2002). Estas inconsistencias pueden deberse al uso de distintas especies, sistemas de expresión o protocolos usados.

Por otro lado, el lazo DI-DII del canal tiene una región que contiene numerosos sitios de fosforilación.

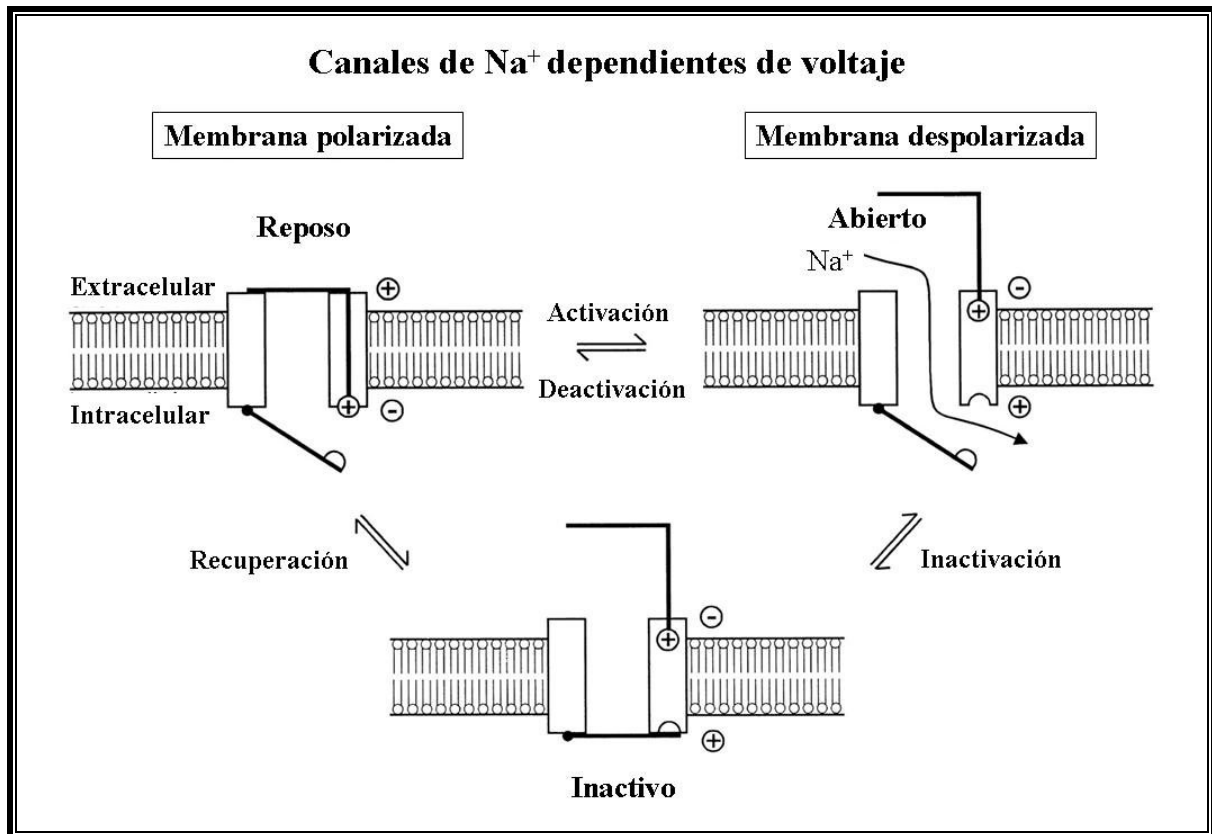
- Subunidades auxiliares

A pesar de que el canal se compone de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , la subunidad  $\alpha$  puede *per se* generar una corriente de sodio. La estequiometría y tipo de subunidades que forman los canales cardiacos de  $\text{Na}^+$  *in vivo* se conocen parcialmente. En mamíferos se han identificado 4 isoformas ( $\beta_1$  a  $\beta_4$ ) de las subunidades reguladoras del canal de  $\text{Na}^+$  (Tabla I.5) (Morgan y cols., 2000; Malhotra y cols., 2001; Goldin, 2002; Yu y cols., 2003). Dichas subunidades  $\beta$  son proteínas con un único dominio TM, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular que presentan una secuencia tipo inmunoglobulina (Ig) que las diferencia del resto de subunidades accesorias (Isom y Catterall, 1996). Estas subunidades no forman parte del poro conductor del canal.

Todas las isoformas identificadas se encuentran en el SNC, pero sólo algunas de ellas se han encontrado en el corazón (Tabla I.5) Se ha propuesto que el motivo Ig puede participar en la modulación del *gating* del canal (Chen y Cannon, 1995; Makita y cols., 1996; McCormick y cols., 1998 y 1999). Además las subunidades  $\beta_1$  regulan la expresión en la membrana, la localización y la unión con otras moléculas de la matriz extracelular y del citoesqueleto de la subunidad  $\alpha$  (Isom y Catterall, 1996). Más aún, la subunidad Nav $\beta_1$ 1 disminuye la afinidad de anestésicos locales y fármacos antiarrítmicos del grupo I por la subunidad  $\alpha$  Nav1.5 (Balser y cols., 1996; Makielski y cols., 1996; Balser, 2001). Sea como sea, la importancia de estas subunidades queda recalcada en distintas patologías relacionadas con alteraciones en la  $I_{\text{Na}}$  asociadas a mutaciones en estas proteínas auxiliares (Amin y cols, 2010). Por ejemplo, hay mutaciones en las subunidades  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  asociadas a síndromes arritmogénicos como el síndrome de Brugada (SBr) (Watanabe y cols., 2008; Riuró y cols., 2013; Hu y cols., 2009) y mutaciones en la subunidad  $\beta_4$  asociadas a SQT tipo 10 (Medeiros-Domingo y cols., 2007). Por último, la subunidad  $\beta_1$  parece jugar un papel fundamental en las interacciones entre subunidades  $\alpha$  al ser totalmente necesaria para producir el efecto dominante negativo (EDN) de un mutante del canal Nav1.5 asociado a SBr (Mercier y cols., 2012).

#### 4.2. Características de la $I_{Na}$

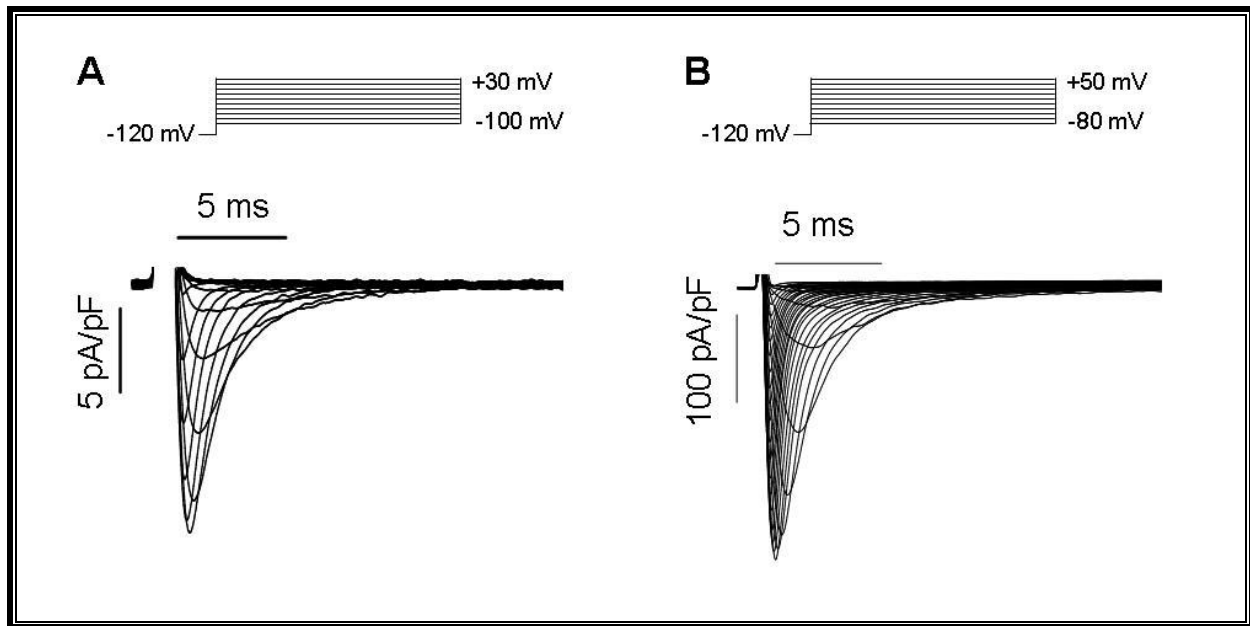
El canal de  $Na^+$  presenta, al menos, tres estados conformacionales: reposo, activo e inactivo (Figura I.23). Se denomina “*gating*” de un canal a las transiciones tiempo-dependientes entre los estados conformacionales del canal debido a los cambios en el potencial de membrana (“voltage-dependent *gating*”).



**Figura I.23. Modelo cinético del *gating* del canal de  $Na^+$ .** Modelo cinético sencillo dónde únicamente aparecen tres estados para el canal de  $Na^+$ : abierto, inactivo y cerrado. [Adaptada de Lehmann-Horn y Jurkat-Rott, 1999].

Durante la diástole, cuando el potencial eléctrico TM está alrededor de los -85 mV, el canal de sodio se encuentra en estado de reposo y la probabilidad de que se abra es extremadamente baja. La despolarización de la membrana produce un cambio conformacional en la estructura del canal (en la región S4) que causa su apertura durante 1-2 ms, generándose una corriente rápida de entrada de  $Na^+$ , que, por su parte, origina la rápida despolarización de la membrana durante la fase 0 del PA (Hirschberg y cols., 1995; Yang y Horn, 1995) (Figura I.23 y I.25A y B). La  $I_{Na}$  alcanza un pico máximo en 0.5-1 ms, y, a continuación, se inactiva de forma rápida lo que produce el cese de la entrada de  $Na^+$  (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003) (Figura I.23 y I.24). El umbral de activación de la corriente se encuentra en -60 mV y alcanza su valor máximo entre -30 y -20 mV (Hodgkin y Huxley, 1952a y 1952b; Armstrong,

1981). La inactivación no sólo cierra el canal, sino que impide la reapertura del mismo hasta que haya pasado el tiempo suficiente para su recuperación (reactivación, ver más adelante), determinando así la frecuencia máxima de excitación celular y preservando el gradiente iónico intracelular, lo que impide la muerte celular.



**Figura I.24. Características de la  $I_{Na}$  cardiaca.** (A) Trazos de  $I_{Na}$  registrados en nuestro laboratorio de miocitos auriculares humanos tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -100 y +30 mV desde un potencial de fijación de -120 mV con una concentración de  $Na^+$  en la solución externa de 5 mM. (B)  $I_{Na}$  registrada en nuestro laboratorio en células CHO transfectadas con las subunidades  $\alpha$  Nav1.5 y  $\beta$ 1 tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -80 y +50 mV desde un potencial de fijación de -120 mV con una concentración de  $Na^+$  en la solución externa de 136 mM.

La inactivación de la  $I_{Na}$  cardiaca sigue un proceso biexponencial, presentando un componente rápido y uno lento (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985; Balser, 2001). La rapidez de la activación y la inactivación sugiere que ambos procesos podrían estar acoplados (Aldrich y cols., 1983; Catterall, 2000; Balser, 2001; Ulbricht, 2005). En ocasiones, los canales de  $Na^+$  pueden transitar directamente desde el estado abierto al estado cerrado; a este proceso se le denomina “deactivación del canal” (Figuras I.23) (Horn y cols., 1981). Se ha propuesto que la inactivación rápida del canal de  $Na^+$  se produce por el mecanismo denominado de “bola y cadena” según el cual la compuerta de activación del canal se abre y la “bola” inicia un movimiento que permite su unión con la boca citoplasmática del canal a la que ocluye, impidiendo la entrada de  $Na^+$  (Armstrong y Bezanilla, 1977). Se ha demostrado la “bola” que se balancea y ocluye la boca citoplasmática del canal está formada por tres residuos hidrofóbicos presentes en el lazo DIII-DIV, la

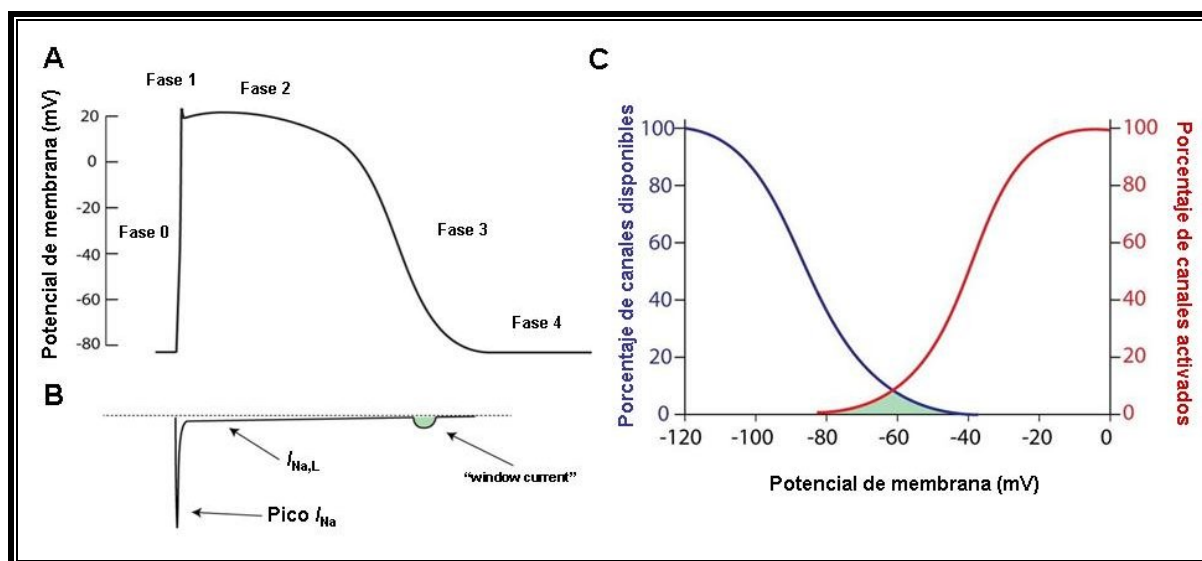
“secuencia IFM”, muy conservada entre especies y entre subtipos del canal (Ile1488, Phe1489 y Met1490) (Eaholtz y cols., 1994). De hecho, la delección de dichos residuos abole la inactivación rápida del canal (Bennett y cols., 1995; Kellenberg y cols., 1996). También se han identificado los residuos del segmento S6 o en el lazo S4-S5 del DIV de la boca citoplasmática que actúan de receptor de la “bola”. Además, el extremo C-terminal participa en la estabilización de la inactivación rápida, disminuyendo la probabilidad de reapertura (Mantegazza y cols., 2001; Cormier y cols., 2002; Motoike y cols., 2004). La “inactivación lenta” es un proceso que se prolonga durante varios cientos de ms y que es responsable del control de la entrada de  $\text{Na}^+$  durante la fase de meseta del PA cardíaco, contribuyendo de este modo al mantenimiento de dicha fase del PA (Clarkson y cols., 1984; Carmeliet, 1987; Fozzard y cols., 1987; Balser, 2001). La inactivación lenta disminuye al aumentar la  $[\text{Na}^+]_e$  (Oxford y Yeh, 1985) y parece estar regulado por un complicado mecanismo en el que están involucrados los cuatro dominios del canal (O’Reilly y cols., 1999; Vilin y cols., 1999).

El paso desde el estado inactivo hasta el estado de reposo se denomina “reactivación del canal” y es un proceso necesario para que éste pueda volver a abrirse (Figura I.23). En situaciones fisiológicas, esta transición tiene lugar durante los primeros 50-100 ms de la diástole por lo que, considerando que en ritmo sinusal (RS) el intervalo diastólico es de entre 500 y 700 ms, cuando llega el siguiente latido la mayoría de los canales ya están en fase de reposo y, por lo tanto, preparados para volver a abrirse (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003).

Por último, una mínima fracción de canales de sodio puede permanecer abierta y no inactivarse completamente. Esta fracción de corriente de sodio ha sido denominada y estudiada como  $I_{\text{Na,L}}$  (corriente tardía de sodio, persistente o *late*) y se ha demostrado que un incremento de esta corriente es arritmogénica, pues lleva a la prolongación de la fase 2 del PA (Makielski y Farley, 2006; Makielski, 2009), pudiendo dar lugar a un SQTl (Figura I.25B y C, I.28 y I.29A, B y C).

Además, algunos canales pueden reactivarse durante la fase de repolarización del PA en un rango de potenciales en el que la inactivación no es completa y se solapa con la activación. Se denomina *window current* por ese rango (“*window*”) de potenciales en el que se produce el pequeño grado de solapamiento entre las curvas de activación y de inactivación. Por lo tanto, en dicho rango de potenciales hay una fracción de canales de sodio que están activos y no inactivos, donde los parámetros de la activación en el estado estacionario y la inactivación no llegan a ser cero (Attwell y cols., 1979) (Figura I.25B y C).





**Figura 1.25. El canal Nav1.5 genera la  $I_{Na}$  durante el PA cardiaco.** (A) PA ventricular en función del tiempo y (B) la  $I_{Na}$  correspondiente en función del tiempo. La “window current” está señalada en verde. (C) Porcentaje de canales disponibles (azul) y activados (rojo) en función del potencial de membrana. La “window current” (indicada en verde) se genera a potenciales en los cuales la activación e inactivación se solapan. [Adaptada de Veerman y cols., 2015]

### 4.3. Biología de los canales Nav1.5: su tráfico

El tráfico intracelular de canales Nav1.5 implica una serie de procesos complejos, desde la regulación del ARNm, la síntesis y ensamblaje de los canales en el RE, su transporte y procesamiento en el aparato de Golgi, su posterior transporte a los subdominios de la membrana donde son funcionales y por último su degradación o reciclaje (Balse y cols., 2012). Cada proceso está coordinado, regulado y facilitado por un gran número de proteínas accesorias.

#### 4.3.1. Regulación del ARNm

Sorprendentemente se conoce poco sobre los mecanismos que regulan la transcripción de *SCN5A*. Parece que cambios en el ARNm del canal Nav1.5 dependen de la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ), aunque se desconoce el mecanismo. Algunos estudios demuestran que la aplicación de un ionóforo del  $Ca^{2+}$  (A23187), que aumenta la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$ , produce un incremento de hasta 5 veces del ARNm de  $Na^+$  mientras que la aplicación de un quelante de  $Ca^{2+}$  (BAPTA-AM) produce el efecto contrario (Chiamvimonvat y cols., 1995).

#### 4.3.2. Mecanismos de tráfico del RE a Golgi

Las subunidades  $\beta$  se unen a Nav1.5 en el RE y promueven el tráfico hacia el Golgi mediante su actividad tipo chaperona. Además, la salida del RE al Golgi depende del balance de dos tipos de señales presentes en la proteína objeto del tráfico: de retención en el RE o/y de salida del RE.

Los motivos de retención en RE quedan enmascarados cuando la proteína está plegada correctamente mientras que, cuando está alterada, están expuestos y la proteína es retenida en el RE. La señal dilisina KK presente en la mayoría de los canales en el dominio C-terminal, no está presente en los canales Nav1.5. Sin embargo se ha descrito la secuencia RxR de retención en RE en el lazo citoplasmático entre el DI y DII del canal Nav1.5 (479RKR481, 533RRR535 y 659RQR661) (Zhou y cols., 2002). Las proteínas 14-3-3 se unen a estas secuencias, por tanto las enmascara, permitiendo la salida del RE del canal (Balse y cols. 2012). Los miembros de la familia 14-3-3 son proteínas adaptadoras citosólicas dimericas (Morrison, 2009). Entre otras muchas funciones, estas proteínas se unen y regulan el tráfico de varias proteínas de membrana (Mrowiek y Schwappach, 2006). Mediante experimentos de coimmunoprecipitación se demostró que 14-3-3 $\eta$  interacciona con la parte N-terminal del lazo citoplasmático entre los DI y DII del canal Nav1.5 (Allouis y cols., 2006), lo que sugería que esta proteína podría enmascarar las secuencias de retención en el retículo RxR presentes en dicho lazo y permitir su tráfico hacia la membrana. Sin embargo otros estudios no observan ninguna influencia de la proteína adaptadora en la densidad de la  $I_{Na}$  pero sí un desplazamiento de la curva de inactivación de Nav1.5 hacia potenciales más negativos y un retraso de la reactivación al coexpresar Nav1.5 y 14-3-3 $\eta$  en células COS (“*CV-1 in Origin with SV40 genes*”) lo que sugería que las 14-3-3 son capaces de modificar las propiedades biofísicas del canal (Allouis y cols., 2006). Además, se vio que las 14-3-3 y Nav1.5 colocalizaban específicamente en los discos intercalares de miocitos (Allouis y cols., 2006). Las proteínas 14-3-3 presentan más afinidad por los canales tetraméricos que por los monómeros lo que facilitaría la salida de los canales adecuadamente ensamblados (Yuan y cols., 2003). Por el contrario, el complejo tipo I que forma la cubierta de las vesículas (*coat complex protein I*, COPI), esencial para el reciclaje de proteínas de membrana desde el Golgi hasta el RE, compite con las proteínas 14-3-3 por su unión a los dominios RxR (Nufer y Hauri, 2003; Duden, 2003). Esto sugiere que los canales mal plegados o mal ensamblados a las subunidades  $\beta$  que presenten una baja afinidad por 14-3-3 se devolverán al RE uniéndose a

COPI (Yuan y cols., 2003).

Por otro lado, la salida del RE de proteínas bien ensambladas puede estar controlada por secuencias diacídicas (secuencia consenso DxEx), presentes en el C-terminal del canal Nav1.5 (secuencia 2008PDRDRESIV2016) (base de datos Entrez Protein, número de acceso Q14524), aunque se desconoce su papel exacto. De manera similar a COPI, el complejo tipo II que forma la cubierta de las vesículas (COPII), necesario para la salida selectiva de proteínas de nueva síntesis del RE, podrían estar implicadas (Duden, 2003). Además, el dominio de unión a PDZ podría tener un papel en el transporte del RE al Golgi (Balse y cols., 2012). Así, proteínas con dominio PDZ como el complejo sintrofina/distrofina, que se une directamente a canales Nav1.5 y al citoesqueleto de actina, haría de nexo entre ambos (Ou y cols., 2003).

#### 4.3.3. Motores moleculares y microtúbulos

Los canales Nav1.5 plegados y ensamblados correctamente se transportan hacia la membrana plasmática a través del RE y el Golgi mediante los microtúbulos y sus motores asociados (Casini y cols., 2010). Casini y cols. demostraron que el tratamiento con taxol de los miocitos (que polimeriza a la proteína tubulina de los microtúbulos) disminuye la  $I_{Na}$  y altera el *gating* del canal (Casini y cols., 2010). Sin embargo hay ciertas contradicciones respecto al efecto producido sobre la corriente  $I_{Na}$  al manipular el citoesqueleto ya que algunos estudios sugieren que es puramente debido a cambios en la cinética y en la probabilidad de apertura del canal mientras que otros sugieren que es por cambios en el número de canales en la membrana (Undrovinas y cols., 1995; Casini y cols., 2010; Balse y cols., 2012).

Los microtúbulos permiten el transporte de vesículas mediante dos tipos de motores: la dineína y las kinesinas, ambos dependientes de ATP. Las kinesinas, de las que hay una gran variedad, actúan en su mayoría como motores anterógrados (Hirokawa y cols., 2009) mientras que la dineína es el principal motor retrógrado. Adicionalmente, la dinactina, cuyo principal componente es la *dinamitina p50*, forma un brazo articulado al que se unen proteínas para ser transportadas por los microtúbulos. La dinactina tiene dos dominios estructurales: un dominio similar a actina, al que se unen las proteínas para ser transportadas, conectado por la

*dinamitina* a otro dominio que interacciona con los microtúbulos (Schroer, 2004; Berezuk y Schroer, 2007). Sobreexpresar la *dinamitina p50* produce un desacoplamiento del complejo dineína/dinactina/dinamitina y por tanto desacopla la unión de la dinactina con su carga (Echeverri y cols., 1996). Sorprendentemente se ha demostrado que la dinactina regula tanto el transporte anterógrado, regulando las kinesinas (Deacon y cols., 2003; Berezuk y Schroer, 2007), como el retrógrado vía dineínas (Vallee y cols., 2004; Haghnia y cols., 2007). Se ha descrito que la inhibición de la dinactina por sobreexpresión de la *dinamitina p50* disminuye la magnitud de la  $I_{Na}$  como consecuencia de una disminución del número de canales expresados en la membrana (Chatin y cols., 2014). Esto sugiere que la dineína regula positivamente el tráfico anterógrado de los canales Nav1.5. Además, se ha descrito que los canales Nav1.5 se unen a través del lazo DI-DII (residuos 417-444) a la *dinamitina p50*.

Además, las proteínas Rab GTPasas, reguladoras del tráfico vesicular, también interaccionan con el citoesqueleto (con la miosina V y VI) (Balse y cols., 2012). Es una familia de hasta 60 GTPasas implicadas en el tráfico vesicular anterógrado y retrógrado del RE al Golgi (Rab1 y Rab2 respectivamente), de Golgi a membrana (Rab6) o de degradación y reciclaje (Rab4, Rab5, Rab11) (Balse y cols., 2012). Sin embargo se desconoce si el tráfico del canal Nav1.5 es totalmente dependiente de Rab.

#### 4.3.4. Inserción de los canales en la membrana

Los últimos pasos para que el canal Nav1.5 sea funcional es su inserción y anclaje/estabilización en la membrana. Sin embargo, se sabe poco sobre la regulación del tráfico del canal Nav1.5 desde el Golgi a la membrana. En un estudio reciente, Agullo-Pascual y cols., utilizando microscopía de fluorescencia de alta resolución, caracterizaron la relación entre la conexina 43 (Cx43), el canal Nav1.5, y la proteína end-binding-1 (EB1). EB1, proteína del extremo positivo de los microtúbulos (*plus end*), se ancla a la membrana, preferentemente en zonas ricas en N-cadherina (proteína fundamental en las uniones célula-célula), para descargar las vesículas que contienen Nav1.5. Sugieren que la Cx43 es parte de este complejo y participa capturando el extremo positivo de los microtúbulos (Agullo-Pascual y cols., 2014). Existen varias poblaciones de canales Nav1.5 en los miocitos cardiacos y quedan muchas preguntas por resolver sobre los mecanismos que regulan el tráfico de canales

Nav1.5 en distintos subdominios de la membrana de los miocitos (que se describen en detalle en el apartado I.5.3.2).

Existen además numerosas proteínas de anclaje que regulan la expresión de canales Nav1.5 en la membrana, como las anquirinas, las caveolinas, proteínas MAGUK (*membrane-associated guanylate kinases*), etc. (que se describen en detalle en el apartado I.5.2.).

#### 4.3.5. Endocitosis

Una vez el canal se internaliza, puede o bien ser reciclado de nuevo a la membrana o bien degradarse vía lisosomas o proteosoma. Su destino dependerá de señales en la proteína o de modificaciones postraduccionales, aunque se ha sugerido que una misma vesícula puede sufrir diferentes destinos dependiendo de las condiciones celulares (Balse y cols., 2012).

La internalización requiere la fisión de la membrana y un remodelado del citoesqueleto. La composición de la membrana está controlada por un equilibrio entre la síntesis de *nov*o de canales y su endocitosis, y dado que la velocidad de endocitosis va a afectar la densidad de canales en la membrana, tendrá muchas repercusiones en la excitabilidad cardíaca.

La endocitosis se lleva a cabo principalmente por dos tipos de mecanismos: los dependientes de clatrina; o los independientes de clatrina, en los que participa la caveolina, y por los que se endocitan los canales Nav1.5, al menos en los miocitos ventriculares (Herfst y cols., 2004). Las caveolinas 1-3 son proteínas integrales de membrana que forman una horquilla en el interior de la membrana dejando su dominio C- y N-terminal orientados hacia el citoplasma. Las caveolinas son las integrantes principales de las *caveolas*, pequeñas invaginaciones de la membrana enriquecidas en colesterol. Posteriormente, la vesícula caveolar endocitada con el canal Nav1.5 se reciclará a la membrana o seguirá la ruta de endosomas tempranos y tardíos (*early* y *late*).

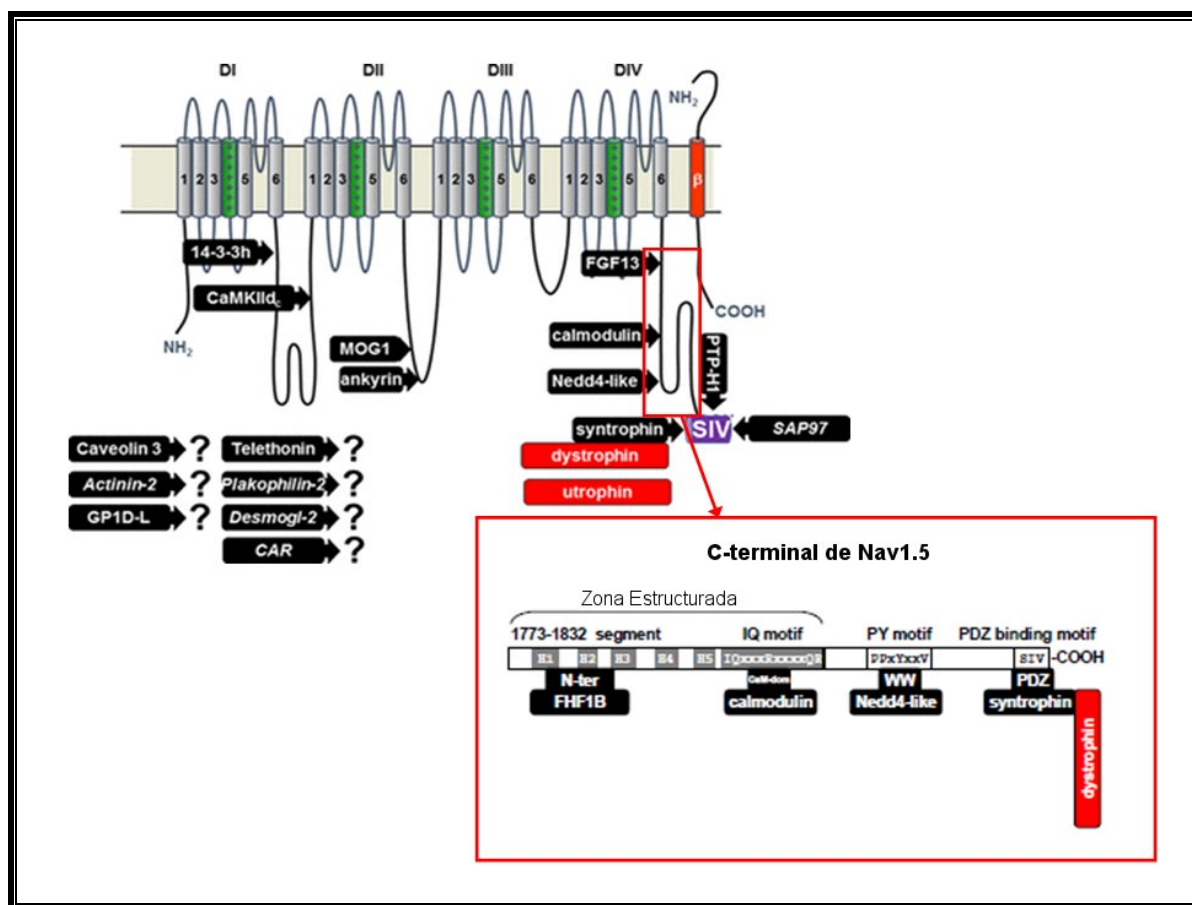
Hay modificaciones post-traduccionales como la ubiquitinación que deciden de forma crítica el destino de las proteínas incluidas en las vesículas, (Marionneau y Abriel, 2015). La ubiquitinación está relacionada con la internalización de proteínas de membrana. Para ello, la proteína diana tiene que presentar un dominio PY (presente en el C-terminal de canales Nav1.5) que interacciona con el cuarto dominio rico en triptófanos (WW) de la enzima (Figura I.26) (Abriel y cols., 2000; Henry y cols., 2003; Rougier y cols., 2005). El aumento de la presencia o de la actividad de la ubiquitin ligasa Nedd4-2 disminuye significativamente la

densidad de la  $I_{Nav1.5}$  debido a una mayor degradación de los canales Nav1.5 (Van Bemmelen y cols., 2004; Rougier y cols., 2005). La proteína chaperona  $\alpha$ B-Cristalina también está implicada en la ubiquitinación e internalización del canal Nav1.5, mediante interacción directa tanto con el canal como con la enzima Nedd4-2 funcionalmente activa (Huang y cols., 2016). La vía de degradación de proteínas ubiquitinadas es el proteosoma. Se ha descrito que la inhibición del proteosoma mediante MG132 (MG132 inhibe la ubiquitinación) recupera el contenido de proteína Nav1.5 y la amplitud de la  $I_{Na}$  en miocitos de ratones deficientes en distrofina mientras que no las modifica en los ratones WT (Rougier y cols., 2013). Estos resultados sugieren que el proteosoma contribuye específicamente a la degradación de canales Nav1.5 en ausencia de distrofina.

Aunque se sabe que la ubiquitinación es un señal de regulación negativa, no está claro si es una señal de internalización o de degradación (Balse y cols., 2012). Por otro lado parece que la ubiquitinación compite con la SUMOilación de los canales ya que tienen una estructura común pero funciones opuestas. La SUMOilación favorece entre otros la estabilización proteica, la modulación epigenética, la progresión celular, o la reparación del ADN (Johnson, 2004).

#### **4.4. Proteínas reguladoras del tráfico de los canales Nav1.5 y modificaciones post-traduccionales**

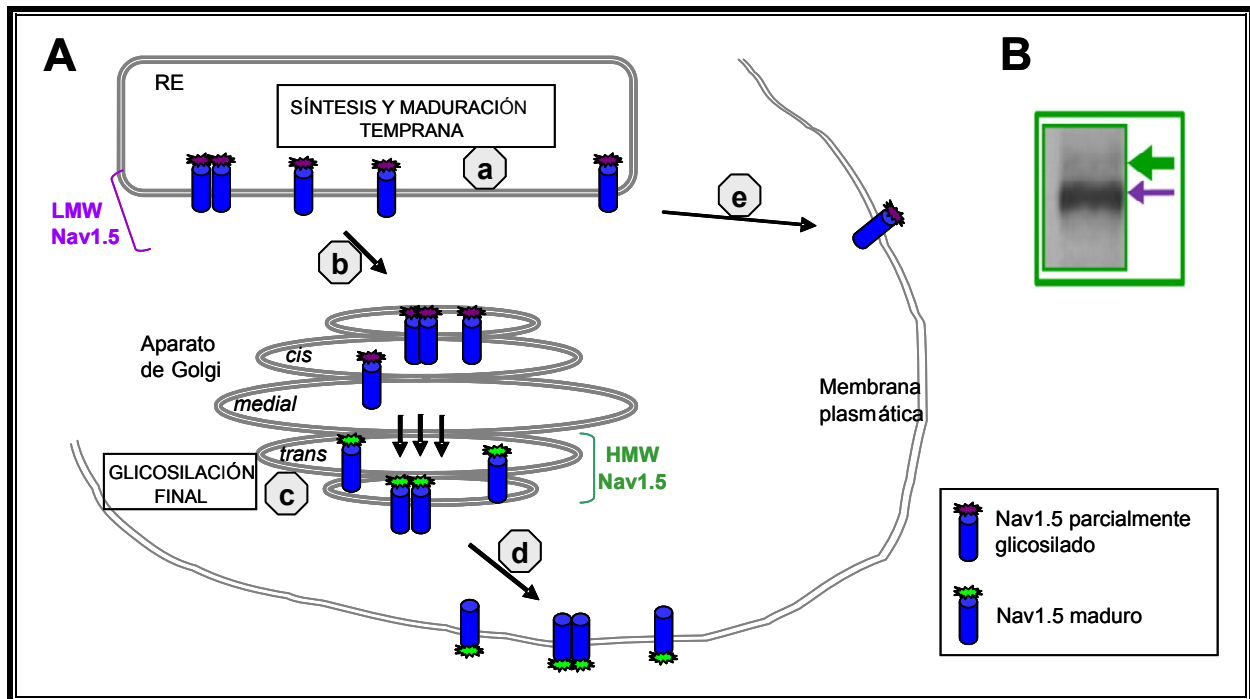
Además de las proteínas que regulan el tráfico de los canales Nav1.5 (Nedd4-2, dinamitina, Cx43, etc.) y las modificaciones post-traduccionales descritas en el apartado 4.3. (glicosilación, ubiquitinación, etc.), los canales Nav1.5 pueden sufrir otras que también regulan su expresión y función. Dada la importancia de los canales de sodio dependientes de voltaje en la generación del PA cardiaco la regulación del canal por proteínas accesorias tiene una importancia crítica. Las proteínas accesorias están implicadas en el tráfico, la regulación de la actividad del canal, su correcta localización celular o/y en su degradación. En cada uno de estos procesos parece que los canales interactúan con varias de estas proteínas accesorias. A día de hoy se conocen más de 20 proteínas que interaccionan directamente con el canal Nav1.5 desde su biosíntesis hasta su degradación, sin contar las que interaccionan de manera indirecta (Figura I.26).



**Figura I.26. Topografía del canal Nav1.5 y las proteínas que interaccionan con el mismo con su sitio de unión.** Las proteínas con punto de interrogación tienen un sitio de unión desconocido. CAR es el receptor del adenovirus y coxsackievirus. Sólo se representa 1 de las 4 unidades  $\beta$  (en rojo). SIV representa el dominio de unión a PDZ. **(Recuadro rojo)** Esquema de la región C-terminal del canal Nav1.5 y proteínas que interaccionan con la misma. Se ha propuesto que la parte proximal (región estructurada) tiene seis  $\alpha$  hélices (partes en gris H1–H5 y el dominio IQ) (Cormier et al. 2002). La parte distal no parece estar estructurada. Se han descrito cuatro regiones implicadas en interacción con proteínas. El N-terminal de FH1FB interacciona con la parte proximal del dominio C-terminal. La CaM, Nedd4, y sintrofina (a su vez unida a la distrofina) se unen a regiones especificadas en el esquema [Adaptadas de Abriel y Kass, 2005 y Abriel y cols., 2015].

- Glicosilación

Si bien la isoforma cardíaca está mucho menos glicosilada que las isoformas neuronales (13 kDa de carbohidratos en Nav1.5 vs 50-60 kDa en las neuronales) (Cohen y Levitt, 1993), parece que el canal en las aurículas está más glicosilado que en los ventrículos, lo que sugiere que hay un proceso de maduración cámara-específico (Arakel y cols., 2014). Además un estudio reciente sugiere que los canales Nav1.5 se expresan en la membrana plasmática de los miocitos cardíacos en dos formas maduras distintas, una forma totalmente glicosilada y funcional que alcanzaría la membrana por la ruta de maduración tradicional (RE-Golgi-membrana) y otra forma parcialmente glicosilada (no funcional o parcialmente funcional) que alcanzaría la membrana mediante una ruta no convencional independiente de Golgi (Mercier y cols., 2015) (Figura I.27).



**Figura I.27. Modelo hipotético de la maduración y tráfico de canales Nav1.5 nativos (según Mercier y cols., 2015).** (A) Después de su síntesis los canales Nav1.5 se localizan en el interior del RE donde se completa el primer paso de la N-glicosilación (a), generando canales Nav1.5 (azul) de bajo peso molecular (LMW, *low molecular weight*). Después, los canales de LMW glicosilados son transportados al aparato de Golgi (b) donde se añaden o modifican los N-glicanos (c), este proceso de glicosilación final confiere resistencia a la digestión por Endo-H y generan los canales maduros de alto peso molecular (HMW, *high molecular weight*). Por último, los canales trafican a membrana donde son funcionales (d), los canales Nav1.5 pueden tener múltiples destinos dependiendo del contexto de la expresión. Por otro lado, los canales Nav1.5, después de alcanzar el estado glicosilado inmaduro en el RE, podrían utilizar una ruta de tráfico alternativa insensible a BFA, por lo que estarían en membrana en su formas LMW (e). (B) Imagen de western blot donde se aprecian las dos bandas de glicosilación del canal Nav1.5. La flecha superior verde marca la forma HMW y la flecha inferior morada marca la forma LMW [Adaptado de Mercier y cols., 2015].

Una posible explicación para tal fenómeno sería que la N-glicosilación temprana (en RE) sería suficiente para el tráfico hacia la superficie celular de los canales Nav1.5, aunque la adición de más N-glicanos y modificaciones postraduccionales en el aparato de Golgi (presumiblemente en el *trans*) serían requeridas para la funcionalidad del canal.

- Proteínas Cinasas y Fosfatasas

El canal Nav1.5 posee secuencias consenso de unión a la PKA, la PKC y la Calcio-Calmodulina Quinasa II (CamKII).

Los efectos de la PKA sobre la  $I_{Na}$  son objeto de debate, algunos estudios describen una inhibición de la corriente, mientras otros un aumento de la misma, quizás debido a diferencias metodológicas (Sunami y cols., 1991; Zhou y cols., 2002, respectivamente). Lo que sí parece es que la PKA fosforila las serinas S525 y S528 del canal Nav1.5 (Zhou y cols., 2002). El lazo citoplasmático entre los DI y II del canal Nav1.5 contiene varias señales de retención en



el RE del tipo RxR (dónde un residuo x está flanqueado por dos argininas) (479RKR481, 533RRR535 y 659RQR661), siendo el dominio más importante para la retención el 533RRR535. La PKA al fosforilar los residuos S525 y S528, enmascara este dominio de retención, permitiendo un aumento en la salida del RE hacia membrana de canales, produciendo un incremento de la  $I_{Na}$  (Zhou y cols., 2002).

La PKC fosforila la S1503 de Nav1.5, disminuyendo la probabilidad de apertura del canal por estabilizarlo en el estado inactivo inhibiendo la  $I_{Na}$  (Tateyama y cols., 2003; Scheuer, 2011).

Hay pocos estudios respecto a los efectos de la fosforilación de tirosinas. Dos proteínas de la familia Src, la quinasa Fyn y la fosfatasa PTPH1, fosforilan y desfosforilan respectivamente a Nav1.5 modulando principalmente las características de la inactivación del canal. La tirosina fosforilada por Fyn es la Y1495 (situada en el lazo citoplasmático entre los DIII y IV del canal) y la diana de la PTPH1 parece ser el dominio de unión a PDZ (C-terminal) (Rook y cols., 2012).

Respecto a la CamKII, los resultados son contradictorios, pudiendo achacar la disparidad a diferencias entre especies, sistemas de expresión, procedimientos electrofisiológicos, o isoformas de las proteínas utilizadas en los diferentes trabajos. Cabe la posibilidad, sin embargo, de que reflejen la existencia de más de un mecanismo regulatorio dependiente de calcio para el canal Nav1.5. Sin embargo, la combinación de los resultados definen claramente al  $Ca^{2+}$ , a la CaM, y a la CaMKII como reguladores de Nav1.5 (Rook y cols., 2012). Hace menos de un año se publicó un mapa de la fosforilación de residuos de Nav1.5 por CaMKII en células HEK293, demostrando que esta cinasa es capaz de fosforilar *in vitro* diversas serinas y treoninas principalmente situadas en el extremo N-terminal, en el primer lazo intracelular y en el extremo C-terminal del canal Nav1.5 humano (Herren y cols., 2015).

- MOG1 (*Multicopy suppressor of gsp-1*)

MOG1 regula el tráfico nuclear proteico (Baker y cols., 2001). MOG1 y Nav1.5 coimmunoprecipitan y colocalizan en los discos intercalares, produciéndose la unión de ambas proteínas a través del lazo intracelular entre los DII y III del canal Nav1.5 (Wu y cols., 2008). Se conocen mutaciones en *RANGRF*, gen que codifica para MOG1, asociadas a SBr, como la p.E83D, que produce una inhibición de la  $I_{Na}$  debido al tráfico deficiente del canal hacia la membrana plasmática (Kattygnarath y cols., 2011). Se ha demostrado que la inhibición de MOG1 reduce la expresión en la membrana de Nav1.5, reduciendo la  $I_{Na}$ . Por el contrario, la

sobreexpresión de esta proteína es capaz de “rescatar” el tráfico deficiente de varios mutantes de Nav1.5 asociados a SBr (Kattygnarath y cols., 2011; Chakrabarti y cols., 2013), lo cual posiciona a esta proteína como posible diana para el tratamiento de determinados pacientes con SBr.

- Factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs)

Algunos FGFs como el FGF12, FGF13 o FGF14 se unen al C-terminal de Nav1.5 modulando las propiedades del canal. Por ejemplo, la coexpresión de FGF12 (también denominado FHF1B) con el canal Nav1.5 en células HEK293 produce un desplazamiento significativo hacia potenciales más negativos de la curva de inactivación del canal (Liu y cols., 2003). Se ha descubierto que determinados pacientes con SBr poseen una mutación con pérdida de función en FGF12 (p.Q7R). La proteína mutada reduce el pico de  $I_{Na}$  lo que podría explicar el SBr en los pacientes con dicha mutación, y añadiría un gen más a la lista de genes susceptibles de generar SBr (Hennesey y cols., 2013). Por otro lado, la coexpresión de FGF14 con Nav1.5 en células HEK293 produce una disminución del pico de  $I_{Na}$  y un desplazamiento de la curva de inactivación (Lou y cols., 2005). Además, se ha demostrado que el silenciamiento de FGF13 en miocitos ventriculares de ratón produce una disminución en la densidad de la  $I_{Na}$  y una menor velocidad de conducción en monocapas de miocitos (Wang y cols., 2011).

- Proteína similar a Deshidrogenasa Glicerol-3-Fosfato (GPD1-L)

La GPD1-L interacciona con el canal Nav1.5 aunque se desconocen los determinantes moleculares de tal interacción (Valdivia y cols., 2009). Diversas mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica para esta proteína se han asociado a SBr y a muerte súbita del recién nacido, pues conllevan una disminución significativa de la  $I_{Na}$  (London y cols., 2007; Van Norstrand y cols., 2007). Se ha propuesto que dicha disminución podría ser debida a que la pérdida de función de la GPD1-L mutante llevaría a un aumento de la fosforilación de Nav1.5 dependiente de PKC (en particular del residuo S1503) (Valdivia y cols., 2009).

- Regulación por micro ARNs

Los micro ARNs (miRNAs) son pequeñas moléculas de ARN de unos 22 nucleótidos de longitud que regulan la expresión del ARNm complementario (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Estudios electrofisiológicos en células HL-1 demuestran la regulación del canal de  $Na^+$

cardíaco por diversos miRNAs a nivel post transcripcional; en concreto miR-219 aumenta la expresión de canales Nav1.5 lo que conlleva un incremento de la  $I_{Na}$  (Daimi y cols., 2015).

#### 4.5. Canalopatías asociadas a los canales de $Na^+$ cardíacos

La importancia de los canales de  $Na^+$  se pone de manifiesto en la existencia de diferentes enfermedades causadas por mutaciones (se conocen más de 100) en los genes que los codifican, entre las que se encuentran numerosas enfermedades que afectan a la función nerviosa o a la contracción del músculo esquelético y/o cardíaco (Cannon y cols., 1991; Wallace y cols., 1998; Moric y cols., 2003; George, 2005).

A nivel cardíaco, las mutaciones en el gen *SCN5A* se han relacionado con la aparición de arritmias [SQTL, SBr, FA] y/o con defectos en la conducción intracardiaca y fenotipos mixtos (Wang y cols., 1995; Chen y cols., 1998; Schott y cols., 1999; Wei y cols., 1999; Veldkamp y cols., 2000; Tan y cols., 2001; Grant y cols., 2002; Darbar y cols., 2008; Wilde y Postema, 2015) (Tabla I.6). Las patologías asociadas a alteraciones, tanto de estructura como de función, de canales iónicos se denominan *canalopatías*. La prevalencia de canalopatías cardíacas en la población es difícil de evaluar pero se estima que son responsables de aproximadamente la mitad de las muertes súbitas cardíacas (Behr y cols., 2008).

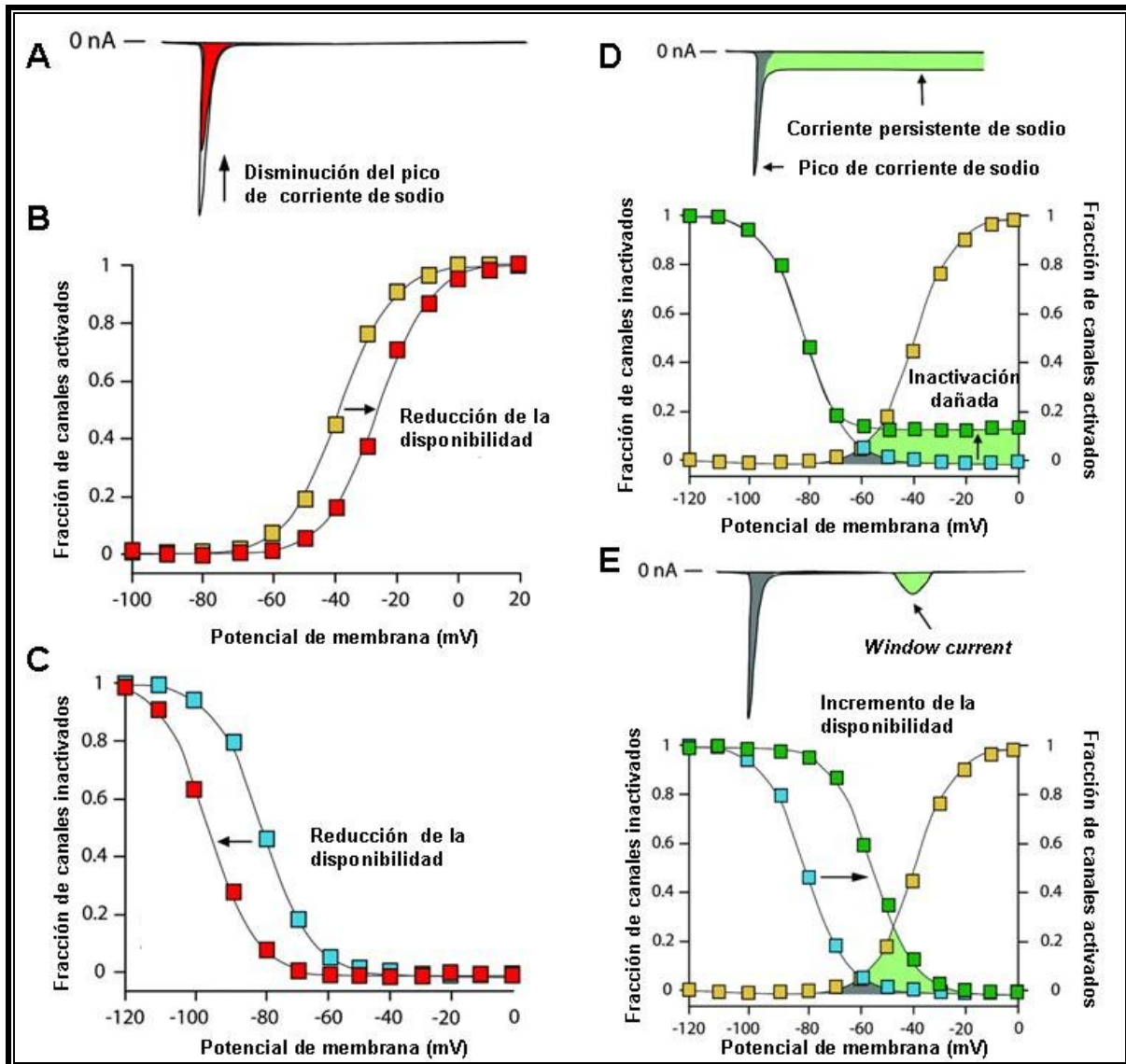
Patología	Características clínicas	Alteraciones en $I_{Na}$	Alteraciones en el ECG
SQTL	Taquiarritmias ventriculares (TdP) Fibrilación ventricular (FV) Síncope Paro cardíaco	↑ disponibilidad del canal Inactivación ralentizada	QT prolongado
SBr	FV Muerte súbita cardíaca	↓ $I_{Na}$ ,	Elevación segmento ST en (V1–V3) ↑ duración del PQ y QRS (con un intervalo QT normal)
Síndrome del seno enfermo (SSE)	Bradicardia sinusal Bloqueo seno-auricular Paro sinusal Alteración de la conducción en el nódulo SA y AV Taquiarritmias auriculares	↓ $I_{Na}$	Ritmo cardíaco irregular o pausas > 2 s Alternancia del ritmo cardíaco acelerado/lento (taquicardia/bradicardia)
Enfermedad progresiva del	Bloqueo senoauricular,	↓ $I_{Na}$	Marcada prolongación de la

Patología	Características clínicas	Alteraciones en $I_{Na}$	Alteraciones en el ECG
sistema de conducción cardíaca (DCCP)	bloqueo AV, bloqueo infrahisiano y bloqueo de rama derecha o izquierda intervalo QT.		onda P y del intervalo PR Ensanchamiento QRS sin elevación del segmento ST o prolongación del intervalo QT
Cardiomiopatía dilatada	Defectos estructurales y arritmias (McNair y cols., 2011)	$\uparrow$ o $\downarrow$ $I_{Na}$	ECG variados Onda P bifásica Depresión del segmento ST y onda T invertida Bloqueo de rama izquierda o derecha Desviación del eje a la izquierda Bigeminismo ventricular

**Tabla I.6. Principales patologías cardíacas asociadas a alteraciones en el gen *SCN5A*.**  $\uparrow$  aumento;  $\downarrow$  disminución; TdP, Torsade de Pointes; SA, senoauricular; AV, auricoventricular [Adaptado de Detta y cols., 2015].

Parte de la variabilidad clínica observada es el resultado directo de los efectos de las mutaciones en las propiedades biofísicas y tráfico del canal Nav1.5. Estos efectos se suelen dividir en ganancia o pérdida de función del canal (es decir, aumento o disminución de la  $I_{Na}$ , respectivamente) (Figura I.28). La ganancia de función se puede deber a un aumento en la  $I_{Na,L}$  (entrada persistente de  $Na^+$  en la fase de meseta del PA), a la inactivación incompleta, o a un aumento de la corriente *window* por un desplazamiento de la curva de inactivación a potenciales más despolarizados (Figura I.28 D y E). El aumento de  $Na^+$  produce un aumento de la DPA y por tanto una prolongación del intervalo QT, dando lugar a la aparición de SQT tipo 3 (Figura I.29C). Por el contrario, las mutaciones que producen una pérdida de función del canal Nav1.5, disminuyen el pico de la  $I_{Na}$ , desplazan la curva de activación a potenciales de membrana más despolarizados, o producen una inactivación del canal más rápida o a potenciales más hiperpolarizados (Figura I.28 A, B y C). Estas mutaciones son responsables del SBr, el SSE, y el DCCP. Algunas mutaciones de *SCN5A* se asocian a FA familiar o generan fenotipos mixtos (síndromes solapados). Estas últimas pueden producir simultáneamente un aumento en la  $I_{Na,L}$  y una reducción del pico de la  $I_{Na}$ , siendo por tanto ganancia y pérdida de función a la vez (Bezzina y cols., 1999). Los pacientes portadores de mutaciones que dan lugar a síndromes solapados pueden presentar características electrocardiográficas tanto de SQT tipo 3 con una prolongación del intervalo QT como de SBr con elevación del segmento ST en las derivaciones  $V_1$  a  $V_3$  simultáneamente. En otros casos lo que ocurre es que diferentes miembros de la familia portadores de la mutación

presentan fenotipos distintos. Este es el caso de la mutación p.D1816VfsX7 identificada en una amplia familia española en la que los diversos portadores presentaban fenotipos que iban desde la FV idiopática, hasta la FA, los defectos de conducción o el SBr (Dolz y cols., 2013).

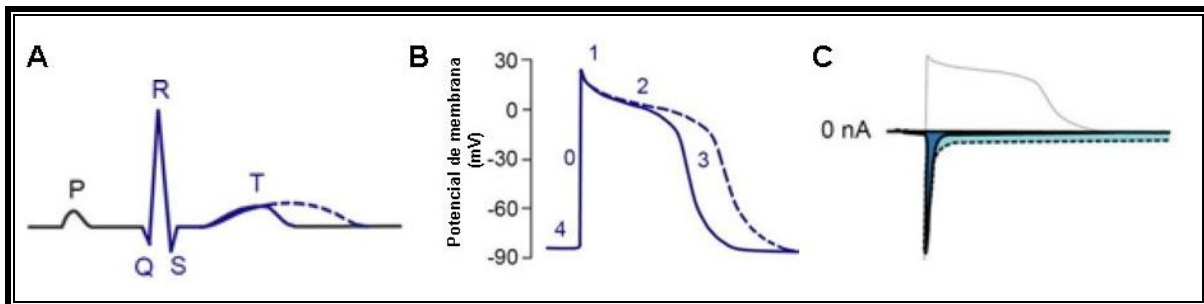


**Figura I.28. Mecanismos que llevan a la reducción del pico de  $I_{Na}$  (A) o al aumento de la  $I_{Na,L}$  (D).** Hay dos mecanismos que conducen a la disminución del pico de  $I_{Na}$ : (B) el desplazamiento de la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales de membrana más despolarizados o, (C) un desplazamiento hacia potenciales más negativos de la dependencia de voltaje de la curva de inactivación. La disminución del pico de corriente a un potencial de membrana dado se debe a que hay menos canales de sodio disponibles. Ambos mecanismos han sido descritos para mutaciones de *SCN5A* asociadas a SBr. Hay dos mecanismos que conducen al incremento de la  $I_{Na,L}$ : un fallo en la inactivación (por ejemplo, los canales no se inactivan completamente) (D) o un incremento en la “window current” (E) debido a un desplazamiento de la inactivación hacia potenciales más despolarizados, incrementando dicha “window current”. [Adaptada de Wilde y Brugada, 2011].

- SQT1

El SQT1 se caracteriza por una marcada prolongación del intervalo QT del ECG consecuencia de la prolongación la DPA a nivel ventricular. Estas alteraciones de la repolarización que pueden producir la aparición de taquicardias ventriculares polimórficas, *Torsades de Pointes* (TdP), FV y muerte súbita (Figura I.29) (Ackerman y Clapham, 1997). Habitualmente, el SQT1 presenta una herencia autosómica dominante (síndrome de Romano-Ward), aunque también existe una variante autosómica recesiva (síndrome de Jervell y Lange-Nielsen) (Ackerman, 2004).

El SQT1 hereditario se divide en 15 tipos descritos hasta la fecha, cada uno relacionado con una alteración genética concreta (SQT1 a SQT15) (Schwartz, 2006; Amin y cols., 2013; Nakano y Shimizu, 2016) (Tabla I.7). Se conocen más de 250 mutaciones asociadas tanto a *SCN5A* como a proteínas accesorias. El SQT1, SQT2 y SQT3 son los tipos más frecuentes, de los cuales, el SQT3 (10% de los casos) es el único asociado a mutaciones en el gen que codifica para la subunidad cardíaca (*SCN5A*) (Roberts, 2006).



**Figura I.29. Actividad eléctrica cardíaca y SQT1 asociado al incremento de  $I_{Na,L}$ .** (A) Prolongación del intervalo QT en un ECG de superficie. (B) Prolongación de la DPA debido al aumento de la duración de la fase 2. (C) Incremento de la  $I_{Na,L}$  (azul claro) que puede llevar asociado un SQT 3, 9, 10 ó 12. [Adaptadas de Amin y cols., 2013]

Las mutaciones descritas hasta ahora responsables del SQT3 (Wang y cols., 1995; Splawski y cols., 2000; George, 2005; Napolitano y cols., 2006) producen una ganancia de función del canal de  $Na^+$  o una modificación del acoplamiento activación-inactivación de la inactivación y/o de la deactivación del canal (Figura I.28D y E). El resultado es un aumento de la  $I_{Na}$  durante la fase de meseta del PA ( $I_{Na,L}$ ) (Figura I.29C) que, aunque es de amplitud muy pequeña ( $\approx 0.5$ -2% respecto a la amplitud máxima de la  $I_{Na}$ ), es suficiente para producir la prolongación de la DPA (Bennett y cols., 1995; Dumaine y cols., 1996; Tamargo, 2000). Es frecuente que en estos pacientes las arritmias se desencadenen cuando están descansando o

durmiendo a diferencia de los SQT1 y 2 que se manifiestan en el ejercicio (especialmente nadar) o bajo estrés emocional respectivamente (Schwartz, 2006).

Además, se han descrito mutaciones en genes distintos al *SCN5A* que también tienen como consecuencia un aumento de la  $I_{Na,L}$  y que se han relacionado con el SQT1. Estas mutaciones afectan a los genes que codifican proteínas accesorias del canal Nav1.5 como la caveolina3 (Cav3) (SQT19) (Vatta y cols., 2006), la subunidad auxiliar Nav $\beta$ 4 (SQT10) (Medeiros-Domingo y cols., 2007) y la  $\alpha$ 1-sintrofina (SQT12) (Ueda y cols., 2008; Wu y cols., 2008).

SQTL	Gen	Proteína	Corriente
Síndrome Romano–Ward			
LQT1	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1	$I_{Ks} \downarrow$
LQT2	<i>KCNH2</i>	KV11.1	$I_{Kr} \downarrow$
LQT3	<i>SCN5A</i>	Nav1.5	$I_{Na} \uparrow$
LQT4	<i>Anquirina-B</i>	Anquirina-B	$Na^+/K^+$ ATPasa
LQT5	<i>KCNE1</i>	MinK	$I_{Ks} \downarrow$
LQT6	<i>KCNE2</i>	MiRP1	$I_{Kr} \downarrow$
LQT7	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	$I_{K1} \downarrow$
LQT8	<i>CACNA1C</i>	CaV1.2	$I_{Ca-L} \uparrow$
LQT9	<i>CAV3</i>	Cav3	$I_{Na} \uparrow$
LQT10	<i>SCN4B</i>	Subunidad SCNβ4	$I_{Na} \uparrow$
LQT11	<i>AKAP-9</i>	Yotiao	$I_{Ks} \downarrow$
LQT12	<i>SNTA1</i>	Sintrofina-α1	$I_{Na} \downarrow$
LQT13	<i>KCNJ5</i>	Kir3.4	$I_{KACH} \downarrow$
LQT14	<i>CALM1</i>	Calmodulina1	Alteración en la ruta de señalización del calcio
LQT15	<i>CALM2</i>	Calmodulina2	
Síndrome Jervell y Lange–Nielsen			
JLN1	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1	$I_{Ks} \downarrow$
JLN2	<i>KCNE1</i>	MinK	$I_{Ks} \downarrow$

**Tabla I.7. Bases genéticas del SQT1.**  $\uparrow$  aumento;  $\downarrow$  disminución [Adaptada de Nakano y Shimizu, 2016]

Por último, se ha identificado un polimorfismo (p.S1102Y) que aparece con mayor prevalencia en la población afroamericana asociado con un aumento de la densidad de la  $I_{Na,L}$ .

tras la administración de diferentes fármacos (Splawski y cols., 2002). Esta prolongación del intervalo QT producida por la administración de fármacos se denomina “SQTL adquirido”.

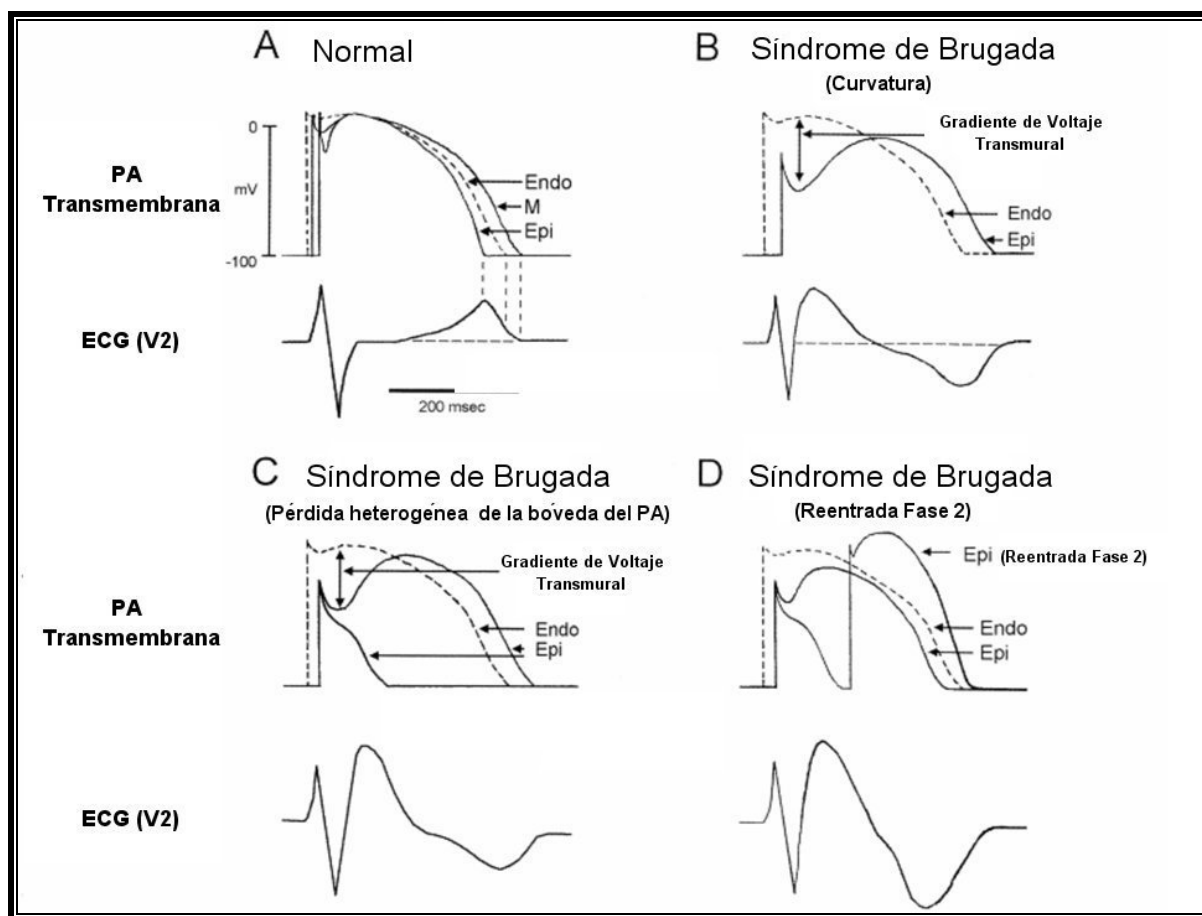
El tratamiento farmacológico depende del tipo de SQTL del paciente. La mexiletina es especialmente efectiva en pacientes con mutaciones en *SCN5A* que dan lugar a canales con la inactivación retrasada (Ruan y cols., 2007; Mazzanti y cols., 2016), aunque a altas dosis, es proarrítmica. Los beta-bloqueantes son los fármacos de elección para el tratamiento del SQTL1 y 2, pero en el tipo 3 son menos efectivos (Schwartz y cols., 2001; Bankston y Kass, 2010). La ranolazina ha demostrado ser efectiva tanto para el SQTL3 como para la FA ya que disminuye el pico máximo de la  $I_{Na}$ , pero en particular, inhibe la  $I_{NaL}$  en miocitos auriculares (Antzelevitch y cols., 2011). Sin embargo también inhibe las corrientes de  $I_K$  e  $I_{CaL}$ , por lo que tiene algunos efectos secundarios (Antzelevitch y cols., 2011). El tratamiento de los pacientes de alto riesgo es el desfibrilador cardioversor implantable (DCI) (Priori y cols., 2013).

- SBr

Las mutaciones que producen pérdida de función responsables del SBr reducen la  $I_{Na}$  como resultado de la síntesis de proteínas no funcionales, fallos en el tráfico a membrana de la proteína sintetizada, o una inactivación acelerada del canal (Figura I.28A, B y C) (Grant, 2009). El resultado final es un acortamiento de la DPA en el tejido epicárdico y el aumento de la heterogeneidad de la repolarización ventricular y del riesgo de sufrir FV (Brugada y Brugada, 1992; Antzelevitch, 2001) (Figura I.30). Se discute sin embargo, si la alteración en la repolarización es consecuencia de un retraso en la excitación transmural cardíaca, consecuencia a su vez de la disminución en la excitabilidad cardíaca producida por la disminución de la  $I_{Na}$ .

El SBr se caracteriza por un bloqueo de rama derecha, la elevación del segmento ST en las derivaciones  $V_1$  a  $V_3$  del ECG y muerte súbita en pacientes con un corazón estructuralmente normal. Es más común en hombres que mujeres (debido a diferencias intrínsecas en la expresión de canales entre mujeres y hombres –mayor densidad de  $I_{to}$  en hombres- o debido a diferencias hormonales) (Antzelevitch, 2006; Shimizu y cols., 2007). En algunos pacientes, la fiebre (algunas mutaciones generan canales cuya pérdida de función es mayor al aumentar la temperatura) (Keller y cols., 2005) desenmascara un ECG característico de SBr y desencadena arritmias fatales (Amin y cols., 2008).





**Figura I.30. Representación esquemática de los hipotéticos cambios en el PA ventricular derecho epicárdico responsables de las manifestaciones electrocardiográfica del SBr.** Modelo desarrollado por Antzelevitch para explicar el SBr como una alteración en la repolarización. En el epicardio cuando la  $I_{Na}$  se reduce, hay un cambio en la forma del PA que se manifiesta como una elevación en el ST y una onda T negativa, produciéndose una prolongación en el PA epicárdico, siendo la duración de éste más larga que la de los PAs del endocardio (A) y (B). Sumado a ésta reducción de la  $I_{Na}$ , la  $I_{to}$  repolariza la membrana más allá del voltaje al que los canales de calcio tipo L son activados, resultando en la pérdida de la fase de meseta del PA. Esta pérdida es heterogénea, generando una dispersión epicárdica de la repolarización (C). Tal dispersión permite la reentrada en fase 2, causando un impulso prematuro, que puede generar FV como consecuencia de la reentrada transmural del extrasístole (D). [Adaptadas de Antzelevitch, 2003]

Hay pacientes en los que los dos alelos del gen *SCN5A* están mutados (heterocigosis compuesta). Nuestro grupo describió el caso de un paciente portador de una mutación en uno de los alelos de *SCN5A* que codifica la mutación p.G1748D que genera canales con profundos defectos de *gating* que además prácticamente no trafican a la membrana, lo cual daba lugar a una reducción del pico de la  $I_{Na}$  en un 90% (Núñez y cols., 2013). En el otro alelo, el paciente portaba otra mutación que en este caso codificaba para los canales p.D1690N que, aunque no presentaban marcados defectos en el *gating*, tampoco eran capaces de alcanzar correctamente la membrana plasmática. En este alelo además se detectó el polimorfismo p.H558R que ejerce de chaperona rescantando algunos mutantes del canal Nav1.5 (Marangoni y cols., 2011; Núñez y cols., 2013). Cuando se estudiaron los efectos de la coexpresión de cada una de estos

mutantes con canales WT (p.D1690N+WT: p.G1748D+WT) se observó que las corrientes generadas en ambos casos eran significativamente inferiores al 50% de la corriente generada por canales WT solos (Núñez y cols., 2013). Es decir ambos mutantes actúan como “proteínas venenosas” que son capaces de disminuir la función y la expresión de las proteínas sanas, es lo que se denomina en genética, como ya hemos mencionado, EDN (Sottas y Abriel, 2016). La “haploinsuficiencia”, al contrario que el EDN, implica que la proteína mutada no se expresa y/o funciona sin embargo no interfiriendo con las proteínas WT (Herskowitz, 1987). Además en el trabajo de Núñez y cols., la cotransfección del mutante del canal Nav1.5 p.D1690N sorprententemente restablece los defectos de *gating* del mutante p.G1748D aunque sólo rescata ligeramente su tráfico a membrana (Núñez y cols., 2013).

Hace aproximadamente 10 años, durante la investigación de una mutación identificada en un paciente con SBr, se demostró que al cotransfectar en células HEK293 los canales Nav1.5 mutantes (p.L325R) con los WT en proporción 0.5:0.5 (puesto que la mutación aparecía en heterocigosis en el paciente), la corriente generada ( $I_{Nav1.5}$ ) estaba exageradamente reducida en comparación con la generada en células transfectadas únicamente con la subunidad  $\alpha$  WT (1) (Keller y cols., 2005). Se demostró posteriormente que la disminución de la  $I_{Na}$  no era debida a una mayor degradación de canales Nav1.5 WT, como se había descrito para canales de calcio (Mezghrani y cols., 2008), ya que utilizando un inhibidor del proteosoma (MG132) el nivel de disminución era similar (Mercier y cols., 2012). Este hallazgo fue la primera demostración de que un mutante de Nav1.5 podía producir EDN, cosa, que hasta la fecha, se había demostrado sólo en canales multiméricos como los de  $K^+$ . Más aún, los resultados implicaban que las subunidades  $\alpha$ -Nav1.5, a pesar de que *per se* son capaces de generar canales funcionales, interaccionan entre sí, bien en la membrana celular formando agregados, o bien en alguno de los procesos de síntesis, tráfico a membrana, y reciclaje que sufren los canales durante su ciclo biológico. Posteriormente, diferentes estudios confirmaron que otras mutaciones que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5 también producen EDN (Clatot y cols., 2012; Mercier y cols., 2012; Núñez y cols., 2013). Posteriormente se ha demostrado que las subunidades  $\alpha$ -Nav1.5 pueden coinmunoprecipitar, siendo la primera evidencia bioquímica de que existe de la interacción entre subunidades en la membrana citoplasmática (Clatot y cols., 2012). De hecho para que se produzca el tráfico hacia la membrana de los canales Nav1.5 sintetizados es necesario que en el RE se produzca la interacción entre subunidades  $\alpha$  a través de su dominio N-terminal (Clatot y cols., 2012; Abriel y Sottas, 2014). Si bien estos datos sugieren que los canales de  $Na^+$  se multimerizan,

todavía se desconoce la estequiometría, la localización, y los determinantes moleculares responsables de este fenómeno, aunque parece que la subunidad  $\beta 1$  es fundamental (Mercier y cols., 2012). En último término implican que probablemente varios canales Nav1.5 están agrupados en cada canalosoma.

Otras mutaciones del canal Nav1.5 que aparecen en heterocigosis no producen EDN. Es el caso de la mutación por desplazamiento del marco de lectura p.D1816VfsX7 que genera una proteína truncada sin los 200 últimos aminoácidos del canal (extremo C-terminal) (Dolz-Gaitón y cols., 2013). También se han descrito mutaciones que, a diferencia de las mencionadas anteriormente, se localizan en el dominio N-terminal del canal y producen EDN (p.R104W y p.R121W) (Clatot y cols., 2012). Estos datos indican que la aparición de EDN no está ligada exclusivamente a la presencia de las mutaciones en el DIV y C-terminal del canal.

Aunque la subunidad Nav1.5 es la principal responsable de la  $I_{Na}$  cardíaca, se desconoce en gran parte el papel que juegan en el miocardio otras subunidades  $\alpha$  del canal de sodio (Tabla I.8). Aunque inicialmente se propuso que la subunidad Nav1.8 sólo estaba presente en neuronas intracardiacas (Verkerk y cols., 2012), se han descrito diversas mutaciones en el gen *SCNA10*, que codifica el canal Nav1.8, asociadas al SBr (Hu y cols., 2014). Por un lado se demostró que Nav1.5 y Nav1.8 son capaces de interactuar entre sí y por otro se observó que los mutantes de Nav1.8 son capaces de ejercer un EDN sobre la  $I_{Na}$  generada por Nav1.5, lo que explicaría el SBr en aquellos pacientes portadores de dichas mutaciones. Además en pacientes con diversas miotonías es frecuente la identificación de mutaciones en el gen *SCN4A* que codifica para Nav1.4, cuya expresión mayoritaria es en músculo esquelético. Estos pacientes presentan manifestaciones cardíacas similares a las del SBr y, *viceversa*, hay pacientes con SBr que presentan miotonías (Bissay y cols., 2016). Esta relación entre canalopatías del músculo esquelético y cardíacas asociadas a canales de  $Na^+$  deberá ser estudiada en el futuro.

Otras proteínas accesorias del canal de  $Na^+$  en las que se han descrito mutaciones que se han asociado al SBr son (Tabla I.8): la GPD1-L (London y cols., 2007; Van Norstrand y cols., 2007), las subunidades auxiliares Nav $\beta 1$  (Watanabe y cols., 2008), Nav $\beta 2$  (Riuró y cols., 2013) y Nav $\beta 3$  (Hu y cols., 2009), MOG1 (Kattygnarath y cols., 2011), la SLMAP (Sarcolemmal membrana-associated protein) (Ishikawa y cols., 2012) y la placofilina 2 (PKP2) (Cerrone y cols., 2014).

Gen	Frecuencia	Anormalidades funcionales	Gen	Frecuencia	Anormalidades funcionales
Disfunción en canal de Na <sup>+</sup>			Disfunción en canal de K <sup>+</sup>		
<i>SCN5A</i>	20–30%	$I_{Na}\downarrow$	<i>HCN4</i>	Rara	$I_K\uparrow$
<i>SCN10A</i>	Rara	$I_{Na}\downarrow$	<i>KCNE3</i>	Rara	$I_K\uparrow$
<i>SCN1B</i>	Rara	$I_{Na}\downarrow$	<i>KCNE5</i>	Rara	$I_K\uparrow$
<i>SCN2B</i>	Rara	$I_{Na}\downarrow$	<i>KCND3</i>	Rara	$I_K\uparrow$
<i>SCN3B</i>	Rara	$I_{Na}\downarrow$	<i>ABCC9</i>	Rara	$I_K\uparrow$
<i>GPD1L</i>	Rara	$I_{Na}\downarrow$	<i>KCNJ8</i>	Rara	$I_K\uparrow$
<i>MOG1</i>	Rara	$I_{Na}\downarrow$	<i>KCNH2</i>	Rara	$I_K\uparrow$
<i>SLMAP</i>	Rara	$I_{Na}\downarrow$	<i>PKP2</i>	Rara	$I_K\uparrow$
<i>PKP2</i>	Rara	$I_{Na}\downarrow$			
			Otros		
Disfunción en canal de Ca <sup>2+</sup>			<i>TPRM4</i>	Rara	Potencial de reposo anormal
<i>CACNA1C</i>	1–3%	$I_{Ca}\downarrow$			
<i>CACNB2</i>	1–3%	$I_{Ca}\downarrow$			
<i>CACNA2D1</i>	1–3%	$I_{Ca}\downarrow$			

**Tabla I.8. Bases genéticas del SBr.** ↑ aumento; ↓ disminución [Adaptada de Watanabe y Minamino, 2016]

Como se puede observar en la Tabla I.8 el SBr se asocia en otros pacientes a mutaciones que producen bien el aumento de la corriente generada por diversos canales de K<sup>+</sup> o bien la disminución de la corriente de calcio tipo L (Watanabe y Minamino, 2016).

El tratamiento de los pacientes con SBr mediante fármacos (isoprotenerol), ablación por radiofrecuencia o bien implantando un DCI es la única estrategia capaz de prevenir la muerte súbita (Priori y cols., 2013).

- SSE o Síndrome Congénito del Nodo del Seno

Este síndrome engloba varias formas de arritmias que pueden ser transitorias (por ejemplo la bradicardia sinusal o la parada sinusal) y son debidas a un mal funcionamiento del nodo SA. En algunos casos el SSE congénito aparece en pacientes muy sintomáticos y generalmente jóvenes que son portadores de mutaciones de pérdida de función en el gen *SCN5A* (Figura I.28A, B y C) (Benson y cols., 2003).

- Enfermedad progresiva del sistema de conducción cardíaca (PCCD)

La PCCD (también llamado enfermedad de Lev-Lenègre) se manifiesta como una prolongación progresiva de los parámetros de conducción (onda P, PR y QRS), y bloqueo de rama derecha o izquierda, sin elevación del segmento ST ni prolongación del intervalo QT. Al igual que el SSE, la forma genética de la PCCD se asocia a mutaciones de pérdida de función en el gen *SCN5A*. De hecho, una sola mutación en *SCN5A* puede producir PCCD aislada o combinada con SBr (Kyndt y cols., 2001; Smits y cols., 2005).

- Cardiomiopatía dilatada

La cardiomiopatía dilatada se caracteriza por una dilatación de las cámaras cardíacas que conduce a alteraciones de la contractilidad y a arritmias ventriculares que desencadenan la muerte súbita del paciente (Detta y cols., 2015). Las causas son muy variadas, pero aproximadamente en el 50% de los casos son idiopáticas. De este 50%, un 20% son casos hereditarios genéticamente determinados (Fatkin, 2011; Detta y cols., 2015). Aunque la implicación de mutaciones en *SCN5A* en la enfermedad es controvertida (Groenewegen y cols., 2005; McNair y cols., 2004; McNair y cols., 2011), se han descrito casos asociados a diversas mutaciones de pérdida de función que dan lugar a canales con alteraciones de *gating* (McNair y cols., 2004). Curiosamente, en la mayoría de los casos estos pacientes presentan otras manifestaciones eléctricas simultáneamente (FA, flutter auricular, bloqueo auricoventricular, taquicardia ventricular y/o FV).

- FA

La FA es una taquiarritmia caracterizada por una activación descoordinada y muy rápida (>350 latidos por minuto) de las aurículas (Nattel, 2002; Fuster y cols., 2006). Es la arritmia cardíaca de mayor prevalencia en la población general (1-2%) y afecta generalmente a pacientes con cardiopatías diversas pero también aparece en gente joven con corazones aparentemente sanos. Los estudios poblacionales sugieren que la FA presenta un componente genético importante. Se han descrito mutaciones tanto de pérdida de función en el gen *SCN5A* (p. ej. p.D1275N y p.N1986K) (Olson y cols., 2005; Ellinor y cols., 2008), *SCN1B* (p. ej. p.R85H y p.D153N) y *SCN2B* (p. ej. p.R28Q) (Watanabe y cols., 2009) como de ganancia de función en el gen *SCN5A* (p. ej. p.M1875T) (Li y cols., 2009) (Figura I.28). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la disminución o el aumento de la  $I_{Na}$  podrían aumentar la susceptibilidad a la FA: un aumento de la  $I_{Na}$  podría inducir actividad desencadenada y

estabilizar los rotores auriculares de alta frecuencia (Kneller y cols., 2005), mientras que la inhibición de la  $I_{Na}$  acortaría la DPA y reduciría la velocidad de conducción y la excitabilidad auriculares, lo que acortaría la longitud de onda del circuito de reentrada y desestabilizaría los rotores de alta frecuencia (Kneller y cols., 2005).

- Otros síndromes arritmogénicos

Por último, se han descrito otras mutaciones que afectan al canal de  $Na^+$  y que se asocian con la muerte súbita del recién nacido (Arnestad y cols., 2007) o el síndrome de repolarización temprana (SRT) tipo 6 (Watanabe y cols., 2011; Antzelevitch, 2012).

## 5. CANALOSOMAS DE CANALES Kir2.x-Nav1.5

### 5.1. Definición de canalosoma

El concepto clásico consideraba que los canales iónicos cardiacos son complejos heteromultiméricos formados por el ensamblaje de la subunidad  $\alpha$ , que forma el poro hidrofílico, con una o más subunidades auxiliares. Sin embargo, en los últimos años se ha hecho evidente que aunque el ensamblaje de estas subunidades puede formar un canal funcional, en la mayoría de los casos, el correcto funcionamiento del mismo requiere su localización específica en una zona determinada del sarcolema, su anclaje al citoesqueleto y/o su unión a proteínas que actúan de plataformas (*scaffold proteins*) y que ponen en relación al canal con otros canales, receptores o enzimas. Este conjunto de proteínas constituye un "canalosoma" y representa la unidad estructural y funcional del canal iónico en la membrana.

Recientemente, las mutaciones en las proteínas y enzimas accesorias que forman parte de los canalosomas se empiezan a asociar a síndromes arritmogénicos hereditarios. En estos casos, los canales iónicos están estructuralmente intactos pero tienen la función y/o expresión alterada, lo que pone de manifiesto la importancia de las funciones biológicas de estas macroestructuras. De hecho, varios estudios recientes sugieren que el canal Nav1.5 forma

parte de varios complejos multiproteicos localizados en distintas regiones celulares (Figura I.36).

## 5.2. Canalosomas de canales Nav1.5

Además de las proteínas reguladoras del tráfico y modificaciones post-traduccionales del canal Nav1.5 que hemos descrito en el apartado I.4.4, otras proteínas anclan al canal en membrana formando macrocomplejos funcionales (*canalosomas*) que regulan la actividad del canal.

Varias de estas proteínas de anclaje tienen dominios PDZ. Los dominios PDZ, cuyo nombre deriva de las tres primeras proteínas en donde fueron identificados [*Post synaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1), y *Zonula occludens-1 protein* (zo-1)] (Kennedy, 1995), son secuencias de aproximadamente 80-90 aminoácidos que permiten interacciones proteína-proteína, jugando un papel fundamental en la organización de complejos proteicos y en la señalización celular (Lee y Zheng, 2010; Ivarsson, 2012). (Ponting, 1997; Ivarsson, 2012).

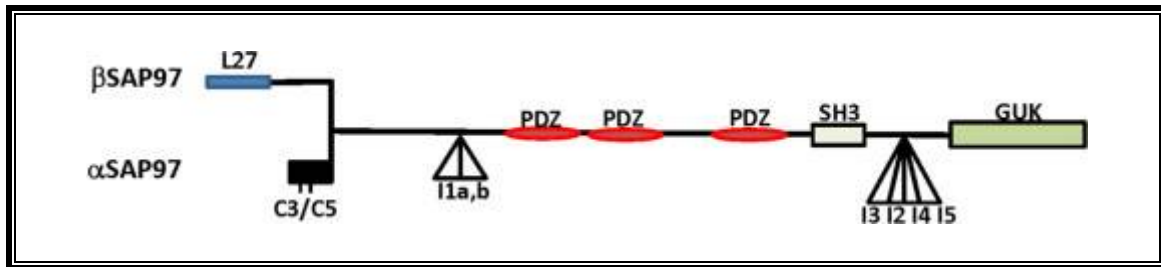
### • SAP97

SAP97 juega un papel importante en el tráfico y en el anclaje de canales iónicos y proteínas a la membrana en varios tipos celulares. SAP97 se expresa de forma abundante en el miocardio, especialmente a nivel de los discos intercalares y túbulos T donde interacciona con canales Nav1.5 (Petitprez y cols., 2011; Abriel y cols., 2015).

La familia MAGUK, a la que pertenece SAP97, PSD-95 (SAP90), PSD-93 (Chapsyn 110) y SAP102, tiene una misma organización de dominios, caracterizada por presentar un dominio análogo a la guanilato kinasa (GUK) inactivo (Elias y cols., 2006). Además del dominio GUK, que carece de actividad enzimática, contienen 3 dominios PDZ, y una región SH3 (*Src homology 3*). SAP97 difiere de los otros miembros de la familia MAGUK en sus dos regiones de *splicing* alternativas que generan múltiples isoformas de SAP97 (Fourie y cols., 2014). Una de ellas se localiza en el N-terminal entre el dominio N-terminal y el primer PDZ en la que hay dos inserciones de *splicing* (I1A e I1B) y la otra región está entre el dominio SH3 y el GUK (Figura I.31) y contiene cuatro inserciones de *splicing*: I2, I3, I4 e I5 (Fourie y cols., 2014). Además, se diferencia entre  $\alpha$ - (presenta 2 cisteínas palmitoiladas) y  $\beta$ -SAP97 (contiene un dominio L27) en función de la secuencia del extremo N-terminal. Las

isoformas que se expresan en miocardio humano son las que presentan el dominio L27 (que le permite polimerizar) y además las regiones I3 e I1A (I3+I1A) (926 aminoácidos) o I3 pero sin I1A (I3-I1A) (893 aminoácidos) (Godreau y cols., 2003) (Figura I.31). La existencia de numerosas isoformas de SAP97, con distintas combinaciones de inserciones de *splicing* regula su localización celular y su capacidad para multimerizar (McLaughlin y cols., 2002).

El dominio SH3 interacciona con secuencias similares a PxxxPR, presente en numerosas proteínas mientras que el dominio GUK se une a proteínas de la familia GKAP/SAPAP1/DAP1 (Wu y cols., 2000). Por su lado la región N-terminal y la zona entre SH3 y GUK modula la unión de SAP97 al citoesqueleto (Wu y cols., 2000).



**Figura I.31.** Diagrama esquemático de la organización estructural de SAP97. [Adaptadas de Fourie y cols., 2014]

En concreto, Nav1.5 se une al dominio 1 del PDZ de SAP97 través de su dominio de unión C-terminal (SIV) (Petitprez y cols., 2011; Milstein y cols., 2012). El silenciamiento de SAP97 mediante *shRNA*, tanto en células HEK293 como en miocitos ventriculares de rata, reduce la expresión de canales Nav1.5 en la membrana citoplasmática y la densidad de la  $I_{Na}$  (Petitprez y cols., 2011). La delección del dominio C-terminal SIV de Nav1.5 reduce la densidad de la  $I_{Na}$  generada. Además, el extremo C-terminal, en concreto los tres últimos aminoácidos, del canal Nav1.5 coimmunoprecipita con SAP97 (Petitprez y cols., 2011). Por último, se ha descrito una mutación en un paciente con SBr donde la valina del dominio de unión a PDZ (SIV) se modifica por metionina (SIM), lo que reduce su unión a SAP97 produciendo una disminución de la  $I_{Na}$  (en células HEK293), pero no reduciendo su unión a sintrofina (Shy y cols., 2014a). Estos datos permiten concluir que SAP97 parece regular la localización y función de los canales Nav1.5 en los miocitos cardíacos.

Sin embargo, a pesar de estas evidencias, algunos estudios ofrecen datos contradictorios. Shy y cols. demostraron que en miocitos ventriculares de ratones transgénicos que expresaban canales Nav1.5 sin el dominio SIV ( $\Delta$ SIV) no se modificaba la expresión de canales Nav1.5 en los discos intercalares y la densidad de la  $I_{Na}$  generada por los mismos. Por el contrario, en



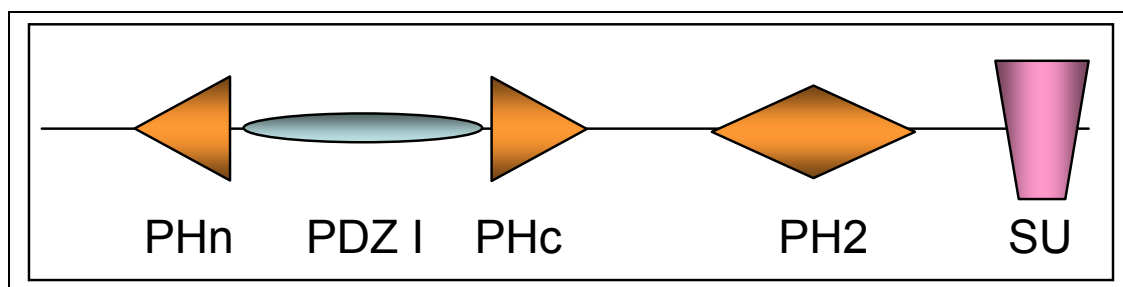
estos miocitos sí se reducía la expresión de canales presentes en las membranas laterales así como la densidad de corriente generada por ellos (Shy y cols., 2014a). El grupo del Dr. Abriel también demostró que la densidad de la  $I_{Na}$  no se veía afectada en ratones *knockout* específicos cardiacos para SAP97 (Gillet y cols., 2015).

- La sintrofina

Las sintrofinas son una familia de proteínas citoplasmáticas adaptadoras. Es un grupo de proteínas heterogéneo de 58 a 60 kDa caracterizado por tener un “dominio único o específico de sintrofinas” en su C-terminal (SU) que les permite dimerizarse (Peters y cols., 1997; Newey y cols., 2000). Además, presentan dos dominios homólogos a plectrina (PH) y un dominio PDZ (Figura I.32). La presencia de varios dominios de unión permite que las sintrofinas interaccionen simultáneamente con distintas proteínas, participando en muchos procesos celulares (Bhat y cols., 2013). Entre otros, la sintrofina ancla canales iónicos al complejo asociado a distrofina, con la cual interacciona directamente

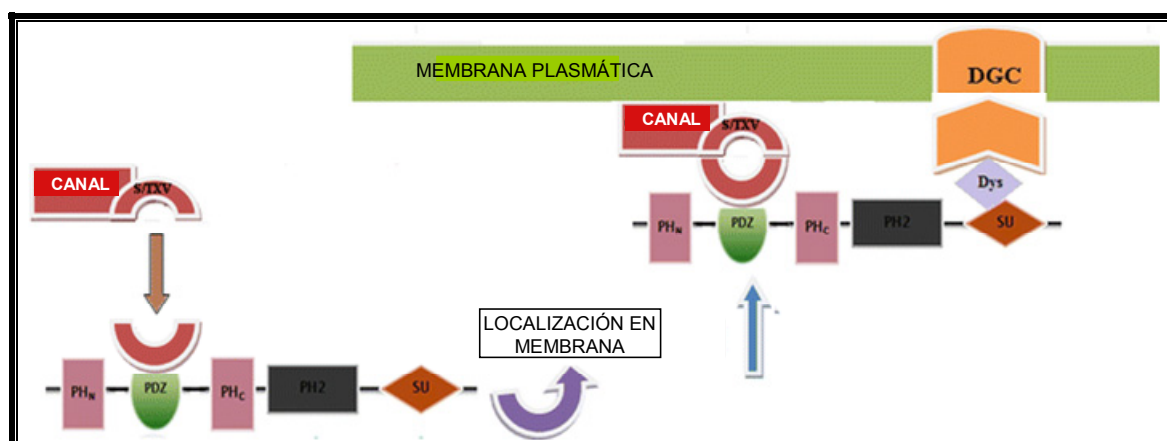
Se han identificado cinco isoformas de sintrofinas de las cuales en los cardiomiocitos de ratón sólo se han detectado tres: la  $\alpha 1$ , que es la forma ácida, y  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , que son las formas básicas de la proteína (Albrecht y Froehner, 2002). Cada isoforma es producto de distintos genes. En los cardiomiocitos humanos la más abundante es la  $\alpha 1$  (Iwata y cols., 2015). La  $\alpha 1$ -sintrofina, codificada por el gen *SNTA1*, tiene 58 kDa, y 505 aminoácidos que provienen de un único ARNm (Bhat y cols., 2013). La isoforma  $\alpha 1$  humana tiene una homología del 94% con la del ratón y un 93% con la del conejo.

Estructuralmente, todas las isoformas tienen la misma organización de dominios (Figura I.32). Debido a que ninguno de los dominios tiene actividad enzimática, se considera que son proteínas adaptadoras que sirven para dirigir a las proteínas diana a sus localizaciones específicas en la membrana celular.



**Figura I.32. Diagrama simplificado de la organización estructural de la sintrofina.** Los aminoácidos del dominio PH1 solapan con el PDZ embebido.

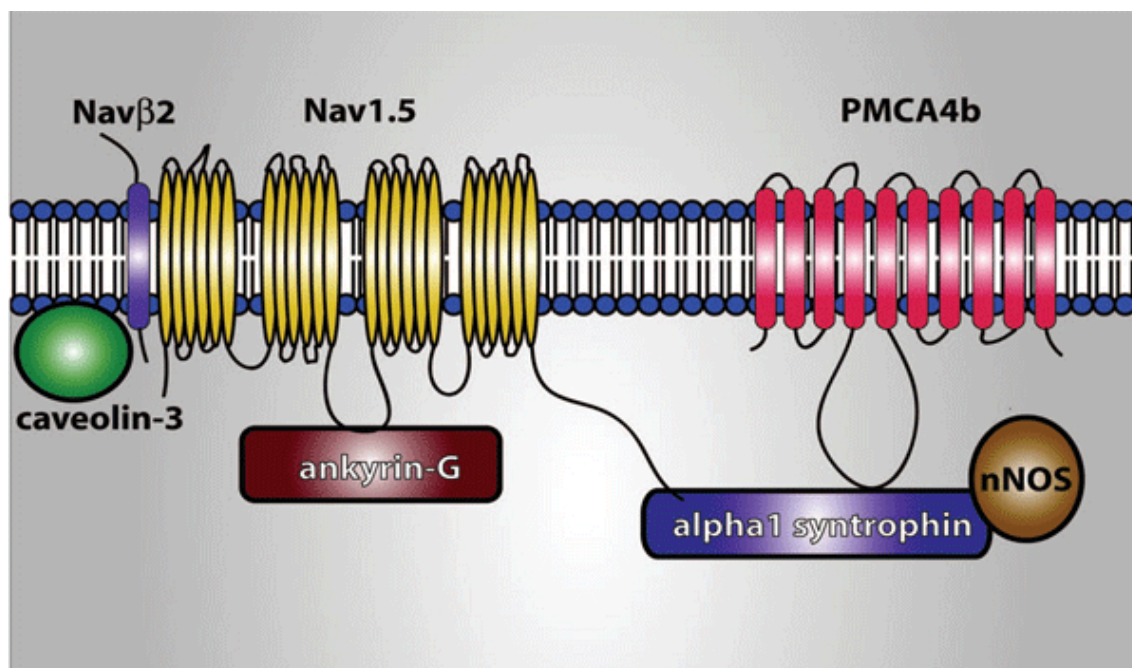
El dominio PH1 está dividido en dos, de los cuales la parte N-terminal (PH<sub>N</sub>) se compone de los aminoácidos 1 a 77 y la C-terminal (PH<sub>C</sub>) del 162 al 271. Entre ambos está el dominio PDZ, estructura globular conservada de casi 80 aminoácidos. La conformación PH<sub>N</sub>-PDZ-PH<sub>C</sub> es muy peculiar y funciona sinérgicamente en la unión de proteínas. El PH1 está especializado en anclar fosfolípidos a la membrana y en la transducción de señales lipídicas (Chockalingam y cols., 1999) y también se une a CaM de manera Ca<sup>2+</sup>-independiente (Jing y cols., 2005). La mitad PH<sub>N</sub> se compone de tres láminas β y una α-hélice C-terminal. El dominio PDZ, que consiste en siete láminas β y dos α-hélice, se inserta en el lazo entre la β3 y β4 de PH<sub>N</sub> (Jing y cols., 2005). El dominio PDZ se encarga de anclar numerosas proteínas, canales, receptores, etc., a la membrana (Bhay y cols., 2013) (Figura I.33). El dominio PH2, que abarca del aminoácido 281 al 406, se une a numerosos lípidos/proteínas para anclarlos en membrana, entre otros el fosfoinositol (PI3) (Lemmon y cols., 2000). Junto al dominio SU, son responsables de la unión de la sintrofina con la distrofina, utrofina y distrobrevina (Figura I.33).



**Figura I.33. Participación de la sintrofina en la localización en membrana de canales iónicos.** [Adaptado de Bhat y cols., 2013]

La interacción entre los canales Nav1.5 y sintrofina se describió por primera vez hace casi 20 años (Gee y cols., 1998). Posteriormente se demostró que la modulación de la  $I_{Na}$  por S-nitrosilación depende de la unión del canal Nav1.5 al complejo PMCA-óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (*Plasma membrane calcium ATPase-neuronal nitric oxide synthase*), que a su vez depende de su unión a sintrofina (Ueda y cols., 2008). Existe por tanto un complejo macromolecular formado por Nav1.5, sintrofina, y nNOS en el que también participa la Cav3 en cardiomiocitos ventriculares de rata que regularía los niveles de S-nitrosilación del canal Nav1.5 (Figura I.34) (Cheng y cols., 2013). De hecho se ha propuesto que diversas

mutaciones en los genes *CAV3* y *SNTA1* comparten un mismo mecanismo de acción: disminuir el efecto inhibitorio que ejercen estas proteínas sobre la nNOS, lo que lleva a un aumento de la S-nitrosilación de Nav1.5 y, como resultado, un aumento de la  $I_{NaL}$  prolongando significativamente la DPA (Cheng y cols., 2013).



**Figura I.34.** Esquema representativa del complejo formado por Nav1.5, sintrofina, nNOS, PMCA y Cav3. PMCA se une a la sintrofina a través del lazo entre sus DIV y V, y se une al PDZ de nNOS vía su C-terminal. La sintrofina además conecta a los canales Nav1.5 al complejo nNOS–PMCA y regula la concentración de óxido nítrico (NO) en la membrana. PMCA es un regulador negativo de NO.

La sintrofina es la responsable de la unión de los canales Nav1.5 a la membrana lateral de los cardiomiocitos (Petiprez y cols., 2011). De la importancia del papel regulador de la sintrofina en la actividad de los canales Nav1.5 da idea el hecho de que se han asociado mutaciones en el gen *SNTA1* (que codifica para la  $\alpha 1$ -sintrofina) al SQT (Wu y cols., 2008; Ueda y cols., 2008) y al síndrome de muerte súbita del recién nacidos (Wu y cols., 2008).

- La distrofina

Esta proteína, que forma parte del complejo asociado a distrofina (DAPC), juega un papel estructural muy importante ya que enlaza el citoesqueleto con la matriz extracelular al unir su N-terminal a la actina y su C-terminal al complejo glicoproteico del sarcolema (Ehmsen y cols., 2002). El canal Nav1.5 interacciona con la distrofina vía la sintrofina a la cual se une a través de su dominio de unión a PDZ C-terminal y N-terminal (SLA) (Gavillet y cols., 2006; Petitprez y cols., 2011; Matamoros y cols., 2016) (Figura I.26). La expresión de Nav1.5 y la

densidad de la  $I_{Na}$  de los miocitos cardiacos obtenidos de ratones deficientes en distrofina (*mdx*) están reducidas en un 50% y en un 30% respectivamente. La consecuencia es una alteración en la conducción cardiaca y un aumento en la expresión de utrofina que se produce como consecuencia de un mecanismo compensatorio (Deconinck y cols., 1997; Gavillet y cols., 2006; Albesa y cols., 2011).

- Las anquirinas

Las anquirinas son una familia de proteínas adaptadoras intracelulares que organizan, transportan y anclan proteínas de membrana al citoesqueleto de actina/espectrina, creando de esta manera microdominios dentro de las membranas con distintas propiedades funcionales (Mohler y cols., 2004; Cunha y Mohler, 2006). Se encuentran dos isoformas en los miocitos: la anquirina B (predominante) y la anquirina G (Cunha y Mohler, 2006; Willis y cols., 2015). Sin embargo, sólo la anquirina G se une a Nav1.5 (Lemaitre y cols., 2003) directamente a través de la secuencia VPIAXX-ESD del segmento del lazo citoplasmático entre los DII y III del canal (Figura I.34). Una mutación en este lazo del canal de sodio cardiaco (p.E1053K), asociada a SBr, inhibe la unión de la anquirina G a Nav1.5 impidiendo la correcta expresión del canal en superficie (Mohler y cols., 2004). En otro estudio reciente, los miocitos de ratones deficientes en anquirina G tenían reducida tanto la  $I_{Na}$  como la expresión de Nav1.5 en los discos intercalares, lo que se traducía en una pronunciada bradicardia, problemas de conducción y arritmias ventriculares en respuesta a antagonistas de Nav1.5 como flecainida. Estos resultados demostraban el papel fundamental que juega la anquirina G en la organización de proteínas de membrana a nivel de los discos intercalares (Makara y cols., 2014).

- Las proteínas desmosomales

La PKP2 es un componente esencial de los desmosomas cardiacos. Se conocen al menos 5 mutaciones en el gen *PKP2* que producen SBr asociado a la disminución de la  $I_{Na}$  (Gerull y cols., 2004; Cerrone y cols., 2014). En miocitos de rata, el silenciamiento de *PKP2* produce una inhibición de la  $I_{Na}$  (Sato y cols., 2009; Sato y cols., 2011). A pesar de su relevancia, se desconoce los determinantes moleculares de la interacción de ambas proteínas.

La desmogleína-2, al igual que PKP2, coinmunoprecipita con Nav1.5 (Rizzo y cols., 2012) y mutaciones en el gen que la codifica producen cardiomiopatías ventriculares

arritmogénicas, lo que demuestra la importancia de estas proteínas para modular al canal (Rizzo y cols., 2012).

- Cx 43

La Cx43 es la proteína que mayoritariamente forma los conexomas en el miocardio y por tanto determina el acoplamiento eléctrico entre miocitos estando localizada en las uniones estrechas. La Cx43 junto a los canales Nav1.5 está particularmente presente en un subdominio rodeando las uniones estrechas llamado *perinexus* (Veeraraghavan y cols., 2015). Además, la Cx43 juega un papel fundamental en la organización de los microtúbulos y regula el tráfico de canales Nav1.5. Como ya hemos descrito (ver apartado I.4.3.4), la Cx43 participa capturando el extremo positivo de los microtúbulos exclusivamente en discos intercalares y forma un complejo con canales Nav1.5 (Agullo-Pascual y cols., 2014). En el mismo estudio describen una mutación en Cx43, la p.D378stop, que no afecta al acoplamiento célula-célula pero que produce una disminución significativa de la  $I_{Na}$ . En corazones que sufren remodelación arritmogénica, la Cx43 está disminuida y se redistribuye de los discos intercalares a la membrana lateral. El cambio de localización se acompaña de una disminución de canales Nav1.5 y por tanto de la  $I_{Na}$  (Rook y cols., 2012; Fontes y cols., 2012).

- La Cav3

Las caveolinas participan en la formación de dominios lipídicos o *rafts* llamados caveolas que son microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos (Balijepalli y Kamp, 2008). La Cav3 es la isoforma predominante en el corazón y sirve tanto de proteína de anclaje a las caveolas como de regulación para señalización. El canal Nav1.5 y Cav3 coinmunoprecipitan y colocalizan en membrana lateral (Yarbrough y cols., 2002; Vatta y cols., 2006). Se han descrito mutaciones en *CAV3*, asociadas a cardiomiopatía hipertrófica, SQT9, y al síndrome de muerte del recién nacido (Cohen y cols., 2004; Vatta y cols., 2006; Cronk y cols., 2007). Además, como ya hemos comentado en el apartado I.5.2, se ha demostrado que existe un complejo macromolecular formado por Nav1.5, sintrofina, la nNOS, y la Cav3 en cardiomiocitos ventriculares de rata que regularía los niveles de S-nitrosilación del canal Nav1.5 (Figura I.34) (Cheng y cols., 2013). Se ha propuesto que diversas mutaciones en los genes *CAV3* y *SNTA1* comparten un mismo mecanismo de acción: disminuir el efecto inhibitorio que ejercen estas proteínas sobre la nNOS, lo que lleva a un aumento de la S-

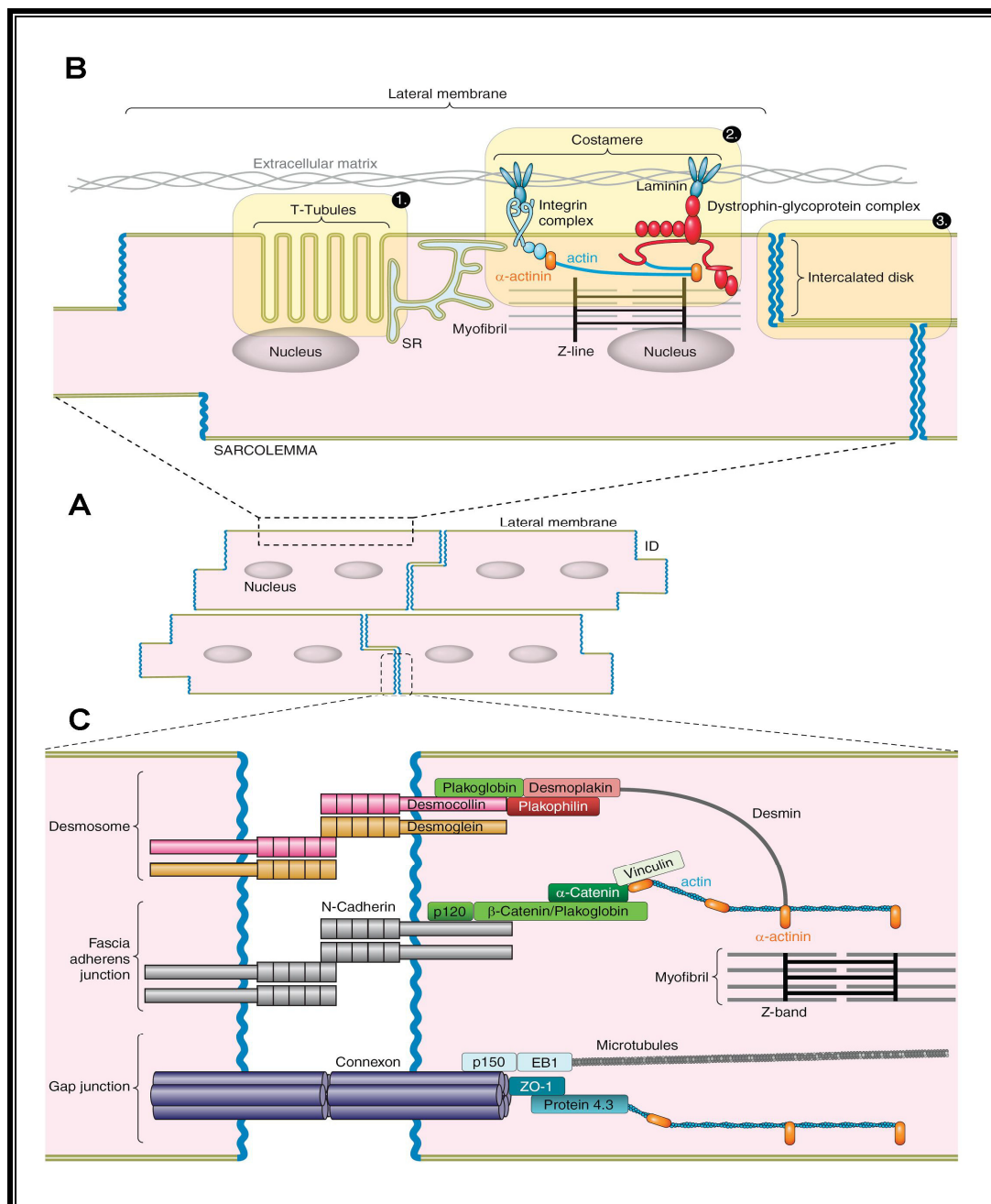
nitrosilación de Nav1.5 y, como resultado, un aumento de la  $I_{NaL}$  prolongando significativamente la DPA (Cheng y cols., 2013).

### **5.3. Distribución de los canales Nav1.5 en los miocitos cardiacos**

#### **5.3.1 Definición de polaridad**

Debido a las características funcionales y estructurales del corazón, hay ciertas especificidades en los miocitos cardiacos que no se comparten con otras células. Los miocitos son células muy diferenciadas especializadas en el acoplamiento excitación-contracción (EC). Tienen por tanto mecanismos eléctricos y mecánicos muy desarrollados. Los distintos dominios funcionales son a) túbulos-T, que son invaginaciones tubulares de la membrana lateral, b) el resto de la membrana lateral, también denominada costámero o crestas, y c) los discos intercalares donde están las uniones célula-célula (Figura I.35). Los miocitos forman auténticos dominios estructurales y funcionales ya que tienen complejos iónicos macromoleculares diferentes y muy organizados.

El sarcómero, la unidad funcional para la contracción, que abarca el área entre las líneas Z, está hecha de tres tipos de filamentos: finos (actina), gruesos (miosina) y elásticos (titina o conectina). Esta unidad constituye el elemento central de la arquitectura de un miocito y es responsable de su apariencia estriada debido a la alternancia de bandas A (filamentos gruesos) e I (filamentos finos). Los microtúbulos se orientan preferentemente en el eje longitudinal mientras que las fibras de actina tienen un patrón tanto longitudinal como transversal.



**Figura I.35. Representación esquemática de los 3 subdominios especializados en miocitos cardiacos: discos intercalares (ID), costámeros en la membrana lateral y túbulos-T.** (A) Representación esquemática de la organización sincitial del miocardio. Se muestra también la polaridad de los miocitos. (B) Recuadro agrandado de la organización de proteínas en la membrana lateral, dividida en costámero y túbulos-T. (C) Recuadro ampliado de la organización de proteínas en los discos intercalares. Los miocitos son células acopladas mecánica- y eléctricamente en el eje longitudinal a través de unas estructuras especializadas: los discos intercalares, organizados en 3 subtipos estructurales: desmosomas, fascia adherens y uniones gap. La línea azul corresponde a la membrana de discos intercalares mientras que la doble línea verde representa el sarcólema. [Adaptado de Balse y cols., 2012]

Los miocitos cardiacos son células alargadas acopladas eléctricamente en el eje longitudinal a través de los discos intercalares, donde el PA se transmite de manera anisotrópica entre dos miocitos adyacentes. La conexión longitudinal entre los miocitos

cardíacos convierte al miocardio en un sincitio funcional. Las numerosas uniones de los discos intercalares aseguran una propagación rápida y coordinada del PA a través del músculo cardíaco. Hay tres tipos de estructuras de adhesión en los discos intercalares: uniones *fascia adherens*, desmosomas, y uniones estrechas (Clark y cols., 2002) que unen proteínas intracelulares del citoesqueleto de miocitos adyacentes en el espacio extracelular.

En condiciones fisiológicas, los miocitos no están acoplados en el eje transversal. Se pueden diferenciar dos estructuras en la membrana lateral, el costámero y los túbulos-T. El costámero une proteínas de los miocitos con la matriz extracelular. En concreto, dos complejos juegan un papel regulador fundamental a este nivel: el complejo integrina, que son proteínas de adhesión y mecanotransductores, y el complejo distrofina-glicoproteína, que incluye proteínas citoplasmáticas, TM y extracelulares, como distroglicanos, distrofina/sintrofina, o la distrobrevina (Lapidos y cols., 2004). Además garantiza el mantenimiento de la organización 3D del miocardio ya que detecta y transmite las fuerzas mecánicas de la sístole y la diástole y recupera la integridad celular. Por otro lado, los túbulos-T están unidos a extensiones del retículo sarcoplásmico donde acoplado con la actividad eléctrica, se produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadenando la contracción (Balse y cols., 2012).

### 5.3.2. Distintas poblaciones de canales Nav1.5

El nivel de expresión, la localización celular y la actividad de canales Nav1.5 están regulados por mecanismos celulares y moleculares complejos. Inicialmente los estudios de inmunofluorescencia limitaron la expresión de los canales Nav1.5 a los discos intercalares (Maier y cols., 2004). Sin embargo, estudios recientes sugieren que existen al menos tres poblaciones de canales Nav1.5 en tres regiones subcelulares distintas: en la membrana lateral, en los discos intercalares y en los túbulos T (Petitprez y cols., 2011; Shy y cols., 2013) (Figura I.36). Estas discrepancias pueden atribuirse al uso de tejido cardíaco o de miocitos aislados, donde puede haber una reorganización de proteínas de membrana.

En la membrana lateral, los canales Nav1.5 están asociados al complejo sintrofina/distrofina (Petitprez y cols., 2011; Shy y cols., 2014a). Los canales que se encuentran en dicha localización del miocito cardíaco forman una población específica encargada de la conducción lateral del impulso cardíaco. La alteración en ratones deficientes



de distrofina (*mdx*) produce una disminución de señal de inmunofluorescencia de Nav1.5 específica en la membrana lateral, y una disminución del 50% de expresión de canales Nav1.5 con una correspondiente disminución del 30% de la  $I_{Na}$  (Petitprez y cols., 2011; Shy y cols., 2013). El hecho que la disminución de la  $I_{Na}$  no sea más marcada puede deberse a un mecanismo compensatorio de la utrofina, cuyos niveles aumentan significativamente en ratones *mdx* (Albesa y cols., 2011). El dominio de unión a PDZ del C-terminal del canal Nav1.5 (SIV) parece fundamental para la unión del canal a sintrofina y por tanto para su localización en membrana lateral (Shy y cols., 2014a). Registros de patch-clamp en membrana lateral de miocitos de ratones con el dominio SIV del canal Nav1.5 truncado ( $\Delta$ SIV) muestran una disminución del 60% en la  $I_{Na}$ . Este dato sugiere que el 40% restante pertenece a otras isoformas del canal de sodio como Nav1.2 o Nav1.8 (Lin y cols., 2011; Kauffman y cols., 2013) o/y que la unión de Nav1.5 es en parte independiente del dominio SIV, y posiblemente dependiente del dominio de unión a PDZ del N-terminal del canal Nav1.5 ( $_{20}$ SLA) (Matamoros y cols., 2016). En este estudio se demuestra que el dominio N-terminal del canal Nav1.5 (132 aminoácidos) ejerce un efecto chaperona sobre canales Kir2.1 y Nav1.5 aumentando la  $I_{Kir2.1}$  y la  $I_{Nav1.5}$  mediante la unión de ambos canales a sintrofina, siendo la serina20 el residuo determinante de la unión. En asociación con la distrofina, la proteína cinasa calcio/calmodulin-dependiente de serina (CASK) de la familia MAGUK se une de manera directa al dominio SIV de canales Nav1.5 en membrana lateral. El silenciamiento de CASK produce un aumento de expresión de canales Nav1.5 en membrana lateral (Eichel y cols., 2016).

Además del complejo sintrofina/distrofina, la anquirina G también se asocia a canales Nav1.5 en membrana lateral, en los discos intercalares y los túbulos T (Hund y cols., 2010; Petitprez y cols., 2011). Esta promiscuidad puede deberse a que la anquirina G participa en el tráfico anterógrado del canal pero no tanto en el anclaje del canal en un dominio específico, a diferencia de las proteínas con dominio PDZ. De manera que la anquirina y las proteínas con PDZ tendrían funciones complementarias y no redundantes. La anquirina G, por su parte, se une a la  $\beta_{IV}$ -espectrina en los discos intercalares (Hund y cols., 2010).

Proteínas como SAP97, PKP2, anquirina G y Cx43 se asocian a los canales Nav1.5 en los discos intercalares (Sato y cols., 2011; Petitprez y cols., 2011; Shy y cols., 2013; Gillet y cols., 2014; Leo-Macias y cols., 2016), pero a pesar de los numerosos estudios, estas interacciones se entienden parcialmente. Es más, parece que existen microdominios de

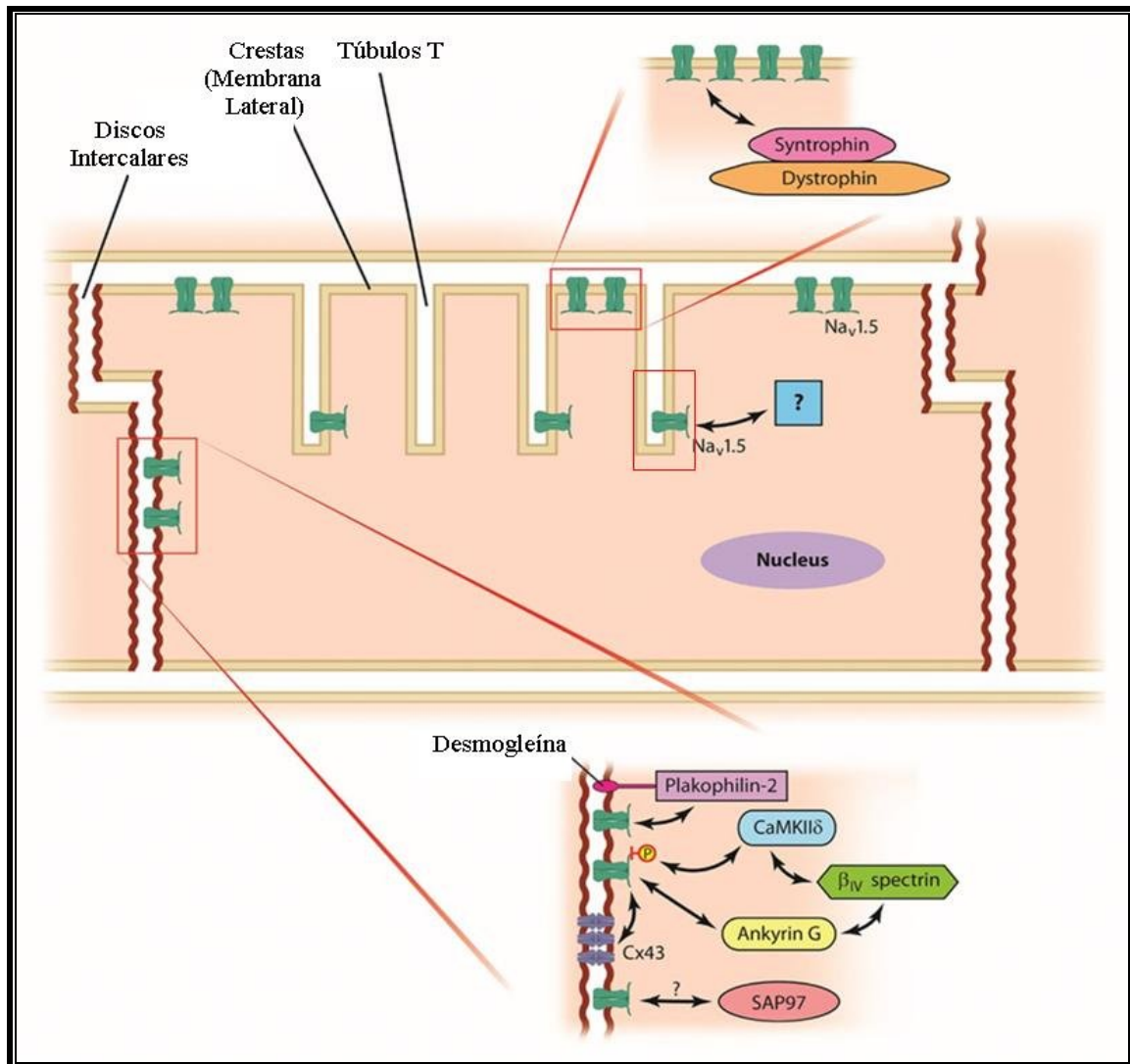
canales Nav1.5 dentro de los discos intercalares. Por un lado, la Cx43 forma parte de un macrocomplejo que “atrae” y ancla los canales Nav1.5 en los discos intercalares, participando por tanto en la conducción (Veeraraghavan y cols., 2015; Leo-Macias y cols., 2016). En este microdominio además de la Cx43 aparecen la PKP2 y la anquirina G (Sato y cols., 2011; Gillet y cols., 2014). Remme (Remme, 2012) ha propuesto que la Cx43 regula de manera indirecta la población de canales Nav1.5 de la membrana lateral y que la redistribución de Cx43 a membrana lateral en situaciones patológicas puede afectar a esta población de canales. Por tanto hay una gran complejidad de interacciones.

Por otro lado, Milstein y cols. demostraron que Nav1.5 interacciona con el canal Kir2.1 y, a su vez, con SAP97 en los discos intercalares y en los túbulos T (Milstein y cols., 2012). Se desconoce si la población de canales Nav1.5 unida a Cx43/PKP2/anquirina G y la población de canales Nav1.5 unida a SAP97 están asociadas o bien son independientes, lo que daría aún mayor versatilidad de regulación del canal.

Como hemos mencionado, el canal Nav1.5 también se localiza en los túbulos T, lo que representaría una tercera población de estos canales en cardiomiocitos (Figura I.36). Estudios anteriores ya sugerían la existencia de esta tercera población ya que tras experimentos de detubulación en miocitos ventriculares de rata, se determinó que un 22% de la  $I_{Na}$  proviene de la región tubular (Brette y Orchard, 2006a y 2006b). Además se ha observado mediante experimentos de inmunofluorescencia que la expresión de los canales Nav1.5 en los miocitos cardiacos presenta un patrón estriado (Milstein y cols., 2012). Esta población se ha observado tanto en los miocitos de ratones WT como en los de los ratones  $\Delta SIV$  (Shy y cols., 2013).

Cabe recalcar que las propiedades de la  $I_{Na}$  en cardiomiocitos son distintas dependiendo de la región subcelular. En la membrana lateral, la  $I_{Na}$  es más pequeña, la curva de inactivación está desplazada a valores más negativos y la recuperación de la inactivación es más lenta que la  $I_{Na}$  registrada en los discos intercalares (Lin y cols., 2011). Estas diferencias podrían explicarse por la diversidad de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal de sodio dependiendo de la región subcelular, si bien la isoforma Nav1.5 representa el 90% de las isoformas de canales de  $Na^+$  presentes en los miocitos cardiacos (Lin y cols., 2011; Kauffman y cols., 2013). De hecho, Kauffman y cols. (2013) describieron la presencia de subunidades Nav1.2 en los discos intercalares, Nav1.4 en los túbulos T, y Nav1.1, Nav1.3 y Nav1.6 en la membrana lateral. Otra teoría más aceptada es que la subunidad  $\alpha$  es la misma (Nav1.5) pero sus

propiedades biofísicas están afectadas por la asociación con moléculas específicas en cada región. Lin y cols. demostraron diferencias en la dependencia de voltaje de la inactivación de canales Nav1.5 según estos estuvieran en las membranas laterales o en los discos intercalares (Lin y cols., 2011). Sin embargo, a pesar de las diferencias no se debe olvidar que ambas poblaciones contribuyen a la propagación y conducción del impulso.



**Figura I.36. Representación esquemática del modelo de los distintos pools de Nav1.5.** Nav1.5 forma parte de distintos macrocomplejos proteicos situados en distintas regiones subcelulares (recuadros en rojo): a) en membranas laterales (crestas) donde interacciona con la sintrofina/distrofina o utrofina, b) En los discos intercalares donde interacciona con SAP97, la anquirina G, la PKP2 o la desmogleína-2, c) Posiblemente hay un tercer macrocomplejo proteico situado en los túbulos T, aunque todavía se desconocen los detalles [Adaptada de Shy y cols., 2014b]

La alteración en la distribución no homogénea de estas poblaciones subcelulares de Nav1.5 como consecuencia de una mutación en el canal o en las proteínas accesorias y su implicación en la generación de enfermedades cardíacas está siendo en los últimos años

objeto de numerosos estudios. Lo que está claro es que esta organización espacial confiere funciones específicas a cada complejo macromolecular en la generación y/o propagación del PA.

#### **5.4. Canalsomas formado por canales Kir2.1/2.2-Nav1.5**

El impulso cardiaco depende de una orquestada interacción de canales iónicos. Controlando el PR de membrana, la  $I_{K1}$  modifica la disponibilidad de los canales de sodio y por tanto, modifica la excitabilidad celular, la DPA, y la velocidad de propagación del impulso (Noujaim y cols., 2007b). Por su parte, de la disponibilidad de los canales de  $Na^+$  dependerá la excitabilidad y la refractariedad cardiacas. Asimismo, las interacciones  $I_{K1} - I_{Na}$  son claves a la hora de determinar la frecuencia de los rotores que generan las arritmias fibrilatorias auriculares y ventriculares (Noujaim y cols., 2007b) (ver apartado I.6).

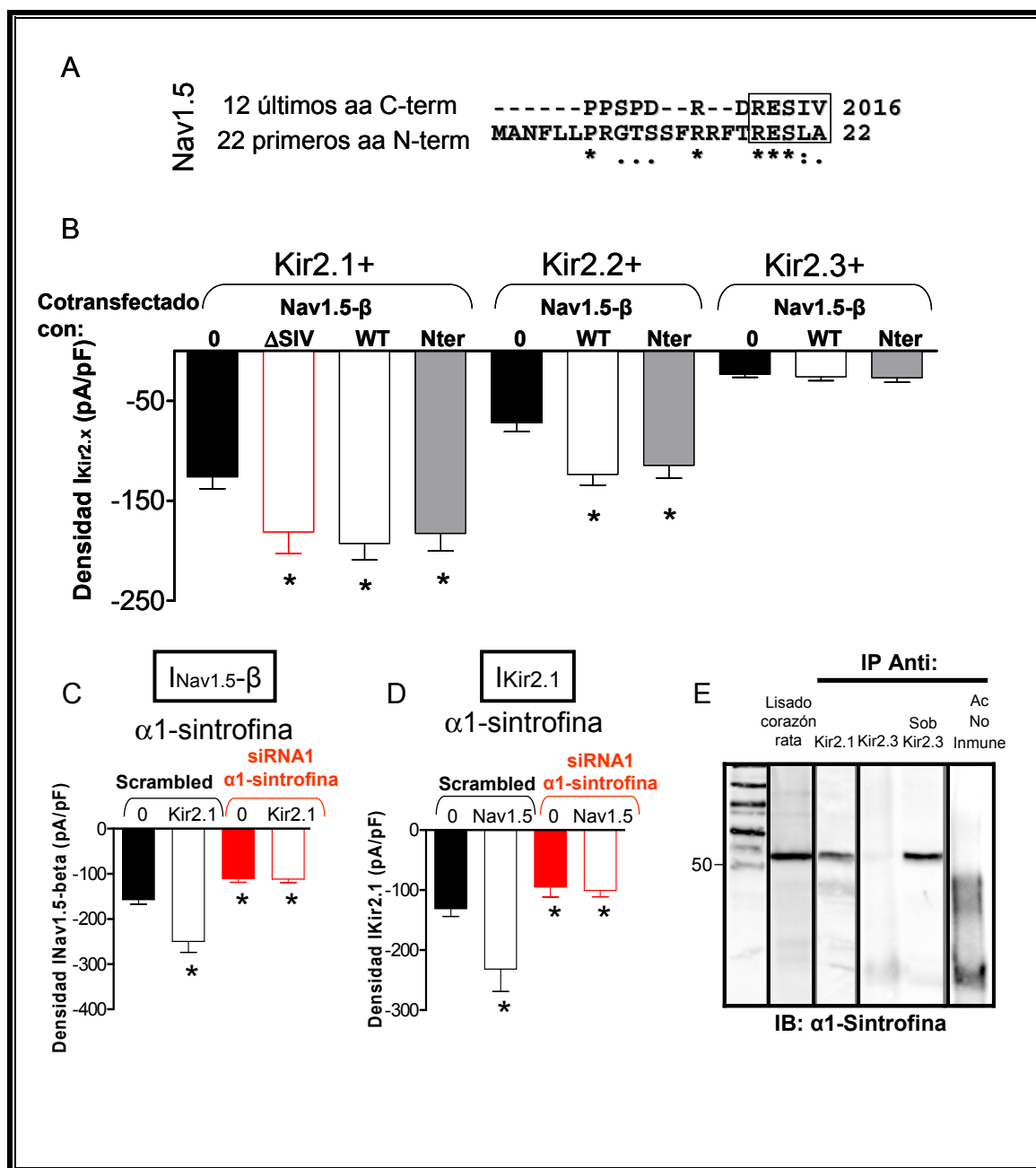
##### **5.4.1. Modulación recíproca positiva Kir2.1-Nav1.5**

Mediante técnicas moleculares, bioquímicas y electrofisiológicas se ha demostrado que existe una modulación recíproca positiva entre la densidad de la  $I_{K1}$  y de la  $I_{Na}$  que es consecuencia de una modulación recíproca positiva de la expresión de los respectivos canales (Kir2.1 y Nav1.5) (Milstein y cols., 2012; Matamoros y cols., 2016). La consecuencia es la perfecta coordinación de los canales que determinan la excitabilidad cardiaca.

Milstein y cols. demostraron en primicia que la sobreexpresión por infección con adenovirus que codificaban el canal Nav1.5 de miocitos ventriculares de rata incrementaba tanto la densidad de la  $I_{Na}$  como de la  $I_{K1}$ . Por otro lado, la sobreexpresión de canales Kir2.1 en miocitos ventriculares de rata mediante adenovirus también producía incremento en la densidad de la  $I_{Na}$  y de la  $I_{K1}$ . Asimismo, la co-sobreexpresión de Nav1.5 y Kir2.1 reducía significativamente la DPA en miocitos ventriculares de ratas neonatales. Por último, Milstein y cols demostraron que las interacciones moleculares entre Kir2.1-Nav1.5 modulan la frecuencia de reentrada en monocapas de miocitos ventriculares de ratas neonatales, produciéndose un aumento de la frecuencia mayor cuando los dos canales eran sobreexpresados que cuando sólo se sobreexpresaban canales Kir2.1. Los autores propusieron, además, que la proteína SAP97 era un componente fundamental para la modulación recíproca de este macrocomplejo molecular formado por al menos estos dos

canales, puesto que dicha proteína posee tres dominios PDZ a los que podrían unirse a la vez al menos un canal de sodio y un canal Kir2.1 (Milstein y cols., 2012).

Más aún, recientemente en nuestro laboratorio hemos demostrado que los canales Nav1.5 incrementan las densidades de la  $I_{Kir2.1}$  y de la  $I_{Kir2.2}$  pero no de la  $I_{Kir2.3}$  (Figura I.37B) El dominio de unión a PDZ, diferente entre Kir2.1/2.2 y Kir2.3 sería responsable de esta diferencia. Asimismo, los canales Nav1.5 no incrementan las corrientes generadas por los canales heterotetraméricos en los que las subunidades Kir2.3 están presentes. El hecho de que la modulación positiva recíproca no ocurra entre canales Kir2.3 y Nav1.5 es clínicamente relevante dada la expresión diferencial de los canales Kir2.x en las aurículas, donde la expresión de Kir2.3 es mayoritaria, frente a la de los ventrículos, donde la  $I_{K1}$  es generada principalmente por los canales Kir2.1. Además, demostramos que la  $\alpha 1$ -sintrofina, capaz de unirse a canales Kir2.1/2.2 pero no a canales Kir2.3, es un componente fundamental para la modulación positiva de este macrocomplejo molecular (Figura I.37C, D y E). Nuestro grupo demostró que los canales Nav1.5 interaccionan con la  $\alpha 1$ -sintrofina tanto a través de una secuencia de unión interna en el extremo N-terminal, siendo crítico el residuo Ser20 de Nav1.5 para la interacción, como a través de la secuencia de unión a PDZ canónico situada en el extremo C-terminal (Figura I.37A y B). El fragmento N-terminal del canal Nav1.5 ejercía de hecho por sí solo de chaperón incrementando tanto la  $I_{Na}$  como la  $I_{K1}$  (Matamoros y cols., 2016).



**Figura I.37. La modulación recíproca positiva de Kir2.1/2.2 y Nav1.5 depende de la  $\alpha 1$ -sintrofina y de la interacción entre el dominio N-terminal de los canales Nav1.5 y el dominio de unión a PDZ de los canales Kir2.1/2.2.** (A) Secuencia de los últimos 12 aminoácidos de los canales Nav1.5 y de los 22 primeros del N-terminal de canales Nav1.5. El recuadro indica los dominios de unión a PDZ y “similares a PDZ”; ‘\*’, residuos idénticos en ambas secuencias; ‘:’, residuos conservados entre grupos con propiedades muy similares; ‘.’, residuos conservados entre grupos de propiedades diferentes. (B) Densidad de  $I_{Kir2.x}$  medida a  $-120$  mV en células transfectadas con canales Kir2.x solos o con Nav1.5 WT, Nav1.5 $\Delta$ SIV, y Nter. \* $P < 0.05$  frente a Kir2.1 o Kir2.2 solos. (C y D) Densidad de  $I_{Nav1.5}$  (C) e  $I_{Kir2.1}$  (D) en células CHO tras el silenciamiento de la  $\alpha 1$ -sintrofina (siRNA1) o incubadas con un siRNA scrambled inespecífico como control. \* $P < 0.05$  frente a  $I_{Nav1.5-\beta}$  en células transfectadas con el scrambled (en C) y \* $P < 0.05$  frente a  $I_{Kir2.1}$  en células transfectadas con el scrambled (en D). (E). Kir2.1 pero no Kir2.3 coimmunoprecipita con la  $\alpha 1$ -sintrofina en corazón de rata. Se muestra también el sobrenadante (Sob) recuperado tras la centrifugación de la muestra con anti-Kir2.3. Como control negativo, el lisado se trató con un IgG no-específico (y Proteína A/G) (carril ‘Ac No-inmune’). IB, anticuerpo utilizado para revelar. [Adaptadas de Matamoros y cols., 2016]

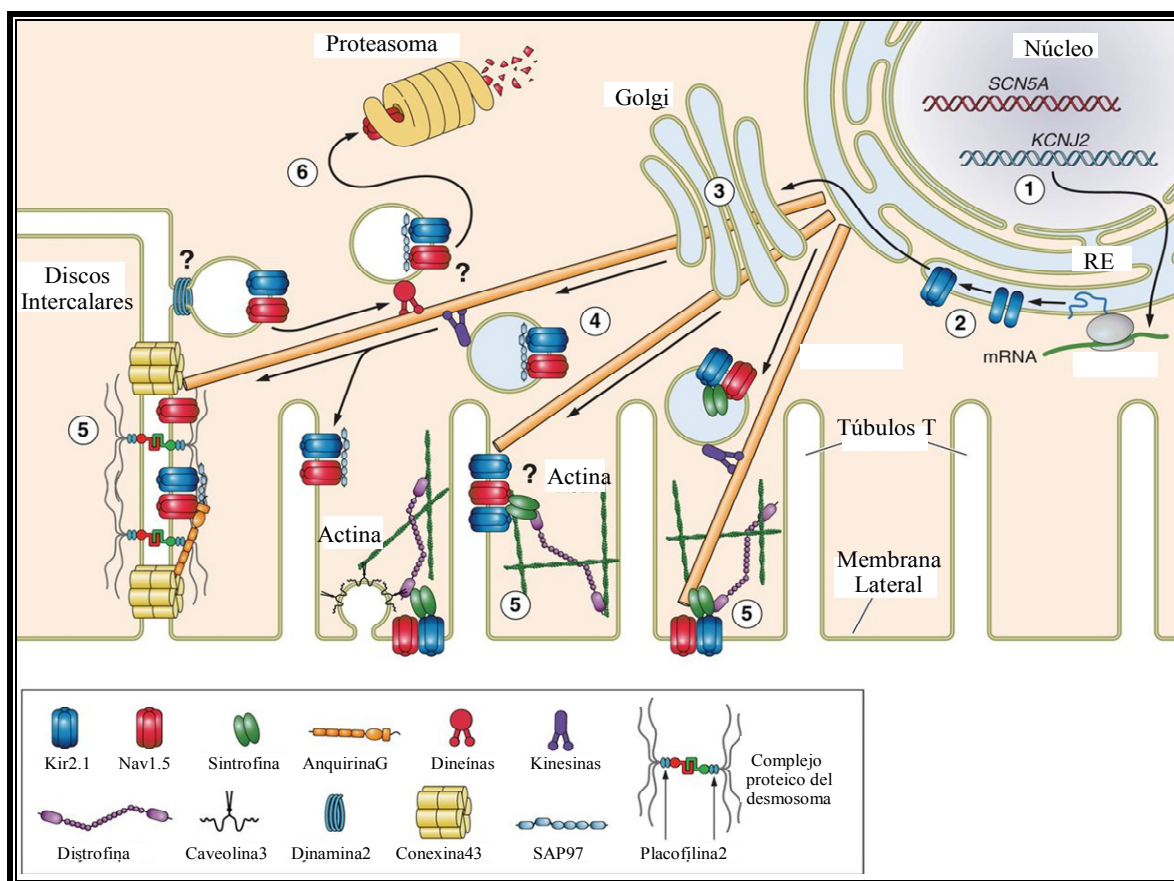
#### 5.4.2. Proteínas implicadas en el tráfico y localización de los canales Kir2.1-Nav1.5

Los canales Kir2.x interaccionan con varias proteínas con las que también interaccionan los canales Nav1.5.

De hecho, los canales Kir2.1-2.3 tienen un dominio de unión a proteínas con dominios PDZ (SEI en canales Kir2.1 y Kir2.2, y SAI en los Kir2.3) por el cual interaccionan con las proteínas pertenecientes a la familia MAGUK SAP97, CASK, Veli-4 y Mint1 (Leonoudakis y cols., 2001). Se ha demostrado que SAP97 regula la  $I_{K1}$  modulando la expresión en superficie de los canales Kir2.x puesto que la unión a SAP97 es importante para anclar los canales Kir2.x a la membrana plasmática (Vikstrom y cols., 2009; Vaidyanathan y cols., 2010; Milstein y cols., 2012). Varios estudios sugieren que SAP97 participa activamente en la localización de los canales Kir2.1 y Kir2.2 en los túbulos T, y de Kir2.1 y Kir2.3 en los discos intercalares (Vikstrom y cols., 2009; Vaidyanathan y cols., 2010).

Por otro lado, Leonoudakis y cols. demostraron también que a través del dominio de unión a PDZ los canales Kir2.x interaccionan con diversos componentes del DAPC, incluyendo las sintrofina  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ , y  $\beta_2$ , la distrofina y la distrobrevina (Leonoudakis y cols., 2001; 2004a; 2004b).

Por tanto, los canales Nav1.5 y Kir2.1 interaccionan con al menos dos proteínas con dominios PDZ: SAP97 y  $\alpha$ -1-sintrofina (Leonoudakis y cols., 2001; Gavillet y cols., 2006; Vikstrom y cols., 2009).



**Figura I.38. Posibles pasos y proteínas asociadas al tráfico intracelular y localización de Nav1.5 y Kir2.1 en un cardiomiocito.** (1) Transcripción; (2) Traducción; (3) Glicosilación en el Golgi; (4) Tráfico vesicular; (5) Localización compartimental y función; (6) Tráfico retrógrado vesicular, degradación proteica y reciclaje. [Adaptada de Willis y cols., 2015]

También se ha constatado que estos canales interactúan con proteínas como PKP2 (Sato y cols., 2011), anquirina G (Mohler y cols., 2004; Cunha y Moler, 2006), distrofina (Petitprez y cols., 2011) y Cav3 (Vaidyanathan y cols., 2013) entre otras, y que mutaciones hereditarias en éstas modifican la expresión funcional y la localización de Kir2.1 y Nav1.5 en los cardiomiocitos (Figura I.38). El silenciamiento de  $\alpha$ -1-sintrofina abole la modulación recíproca positiva entre la  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  (Matamoros y cols., 2016). Pero hasta el momento, no se ha determinado en qué compartimento celular se produce la unión de estos dos canales y se desconoce cuál es el mecanismo por el cual la presencia conjunta de canales Kir2.1 y Nav1.5 aumenta recíprocamente la densidad de la  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$ . Es posible que aumente la estabilidad de los canales en membrana porque disminuya la degradación de los canales que están formando un complejo en el mismo canalosoma. Otra posibilidad es que aumente la glicosilación en el trans-Golgi aumentando la presencia de canales maduros funcionales o el tráfico de los canales desde el RE al Golgi y desde ahí a la membrana. Por último cabe también que se



favorezcan la aparición de rutas de tráfico alternativas que incrementen la expresión en la membrana de estos dos canales (Figura I.38).

#### 5.4.3. Consecuencias clínicas

Los resultados obtenidos hasta la fecha proporcionan la evidencia experimental directa de que los canales Kir2.1/2.2 y Nav1.5 comparten en común proteínas accesorias que son importantes en el tráfico y en la localización en membrana de ambos canales. Las implicaciones patofisiológicas del equilibrio (o desequilibrio) entre la  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  son de particular relevancia en el contexto de los síndromes arritmogénicos adquiridos o hereditarios en los que la densidad funcional de Kir2.1 y Nav1.5 a nivel del sarcolema está modificada. Tal es el caso del SBr y del SAT, pues ambos síndromes hereditarios han sido asociados con mutaciones que disminuyen el tráfico de Nav1.5 y Kir2.1, respectivamente a la membrana.

Dado que los canales Kir2.1/2.2 y Nav1.5 presentan modulación recíproca positiva, es razonable suponer que las mutaciones que disminuyen el tráfico de canales Kir2.1 reducirán la expresión de los canales Nav1.5 y esto debería contribuir a exacerbar el fenotipo arritmogénico al disminuir la excitabilidad celular. A la inversa, es también razonable especular que la disminución de la expresión de canales Nav1.5 estará ligada a la reducción de la expresión de Kir2.1 y por lo tanto de  $I_{K1}$ . Este hecho llevaría a la despolarización de la membrana celular, disminución de la  $I_{Na}$  a través de la deactivación parcial de Nav1.5, y disminuiría aún más la velocidad de conducción e incrementaría la frecuencia de la arritmia.

## 6. ARRITMIAS POR REENTRADA DEL IMPULSO CARDIACO

### 6.1. Conceptos básicos

Clásicamente se distinguen dos mecanismos por los que se generan las taquiarritmias cardíacas: alteraciones en la secuencia de activación del miocardio (*reentrada*) y alteraciones en la iniciación del impulso (*origen focal*). La actividad arrítmica cardíaca puede ser organizada o bien puede ser aparentemente caótica. En este caso se habla de arritmias fibrilatorias. La FV puede desencadenar en pocos segundos la muerte del paciente y es la principal causa de muerte súbita cardíaca. Por el contrario la FA es la arritmia de mayor prevalencia en la población general (más de 1 millón de españoles la padece) y aunque no es una urgencia vital (puede ser crónica) aumenta significativamente la mortalidad de los pacientes. El origen focal consiste en la aparición de un foco ectópico que genera actividad eléctrica automática. En otras ocasiones se deben a alteraciones en la actividad del marcapasos fisiológico (el nodo sinusal) que, o bien aumenta marcadamente su frecuencia de disparo (taquicardia sinusal), o bien la disminuye (bradicardia sinusal). Con mucho, el mecanismo que mayoritariamente da origen a las arritmias cardíacas es la reentrada. En condiciones normales un impulso generado en el nodo sinusal muere tras la activación secuencial de aurículas y ventrículos, puesto que va quedando rodeado de tejido que acaba de excitar y que se encuentra, por tanto, en periodo refractario. Sin embargo, en condiciones especiales, el impulso puede persistir y reexcitar dos o más veces el miocardio (*reentrada*). La reentrada consiste, por tanto, en la perpetuación de un impulso en forma de frente de activación que gira constantemente definiendo con su trayectoria un circuito cerrado (*circuito de reentrada*) y activando el miocardio adyacente en cada giro. Para que se inicie esta recirculación es necesario que el impulso se bloquee en una dirección (*bloqueo unidireccional*), obligando al frente a invadir el circuito en el sentido contrario. El bloqueo se puede producir por la existencia de discontinuidades entre células (desacoplamiento celular o fibrosis), por discontinuidades macroscópicas del miocardio (debido a que éste se organiza en haces de fibras que convergen o divergen en distintos puntos), o por la presencia de obstáculos inexcitables que pueden ser anatómicos (las inserciones de las venas cavas o una escara quirúrgica o de un infarto previo) o funcionales (tejido excitable que en un momento dado no lo es) (Delpón y Tamargo, 2005).

G. Mines y T. Lewis en 1914 y 1915, respectivamente, estudiando la activación eléctrica realizando los experimentos en anillos de medusa y en preparaciones cardíacas de tortuga

propusieron que para que se produjera la reentrada, el frente de activación debía girar en torno a un tejido inexcitable que actuaba como obstáculo anatómico (*reentrada anatómicamente determinada*. P. ej. el flutter auricular) (Mines, 1914; Lewis, 1915). Posteriormente, Rosenblueth y Wiener demostraron la existencia de circuitos en los que no estaba presente de dicho obstáculo (*reentrada funcionalmente determinada*) (Rosenblueth y Wiener; 1946). En este caso el impulso gira en torno a un área del miocardio que puede ser muy pequeña ( $< 1$  cm) que en ese momento no es excitable. Las células parcialmente despolarizadas (p.ej. por la isquemia o la fibrosis) o estimuladas prematuramente antes de que completen la repolarización, en particular cuando hay diferencias en la DPA entre áreas adyacentes, pueden crear áreas inexcitables. En estos circuitos no hay apenas intervalo entre el frente de activación y la estela de periodo refractario del giro anterior (circuitos sin hiato excitable), de modo que se excita tejido sólo parcialmente repolarizado, por lo que la velocidad de conducción es muy lenta.

Ambos mecanismos no son excluyentes entre sí y, de hecho, lo más probable es que puedan coexistir (Nattel, 2002; Fuster y cols., 2006; Kourliouros y cols., 2009).

## 6.2. Evolución de las teorías de reentrada

Dado que la arritmia de mayor prevalencia en la población general es la FA durante los últimos 60 años se ha dedicado un ingente esfuerzo experimental para desentrañar el mecanismo por el cual ésta se genera y se perpetúa. Desde los estudios de llevados a cabo por el Dr. G. Moe, la teoría más aceptada es que la FA se genera por la reentrada del uno o varios impulsos en el miocardio auricular. Por tanto, sírvanos la cronología de las distintas teorías sobre la génesis de la FA para ilustrar la evolución de las teorías de la reentrada del impulso eléctrico.

El Dr. Moe propuso que la FA implicaba la activación caótica, continua y desordenada de la aurícula por múltiples frentes de onda (*multiple wavelets theory*) de longitud y dirección variables (Moe., 1959). Según esta hipótesis, todo el miocardio auricular participaría en el mantenimiento de frentes de activación simultáneos que continuamente giran, se dividen, se fusionan o chocan entre si extinguiéndose. Los frentes de onda se fraccionarían en “ondas hijas” que se autoperpetuarían, propagándose por las aurículas (Moe y cols., 1964). El soporte experimental de esta hipótesis fue aportado por Allesie y cols., (Allesie y cols., 1985) que cartografiaron cómo la excitación se extendía por la aurícula de perros durante la generación de una FA rápida en presencia de ACh, demostrando la existencia de múltiples ondas de

propagación que provocaban una actividad auricular turbulenta. Propuso además la hipótesis de *leading circle* en donde las ondas girarían alrededor de un obstáculo funcional y el frente de onda se establecería de tal forma que recorriese el mínimo trayecto para mantener la reentrada (Allesie y cols., 1985; Comtois y cols., 2005; Jalife, 2011; Pandit y Jalife, 2013). Un concepto importante para comprender la teoría de Allesie es el de *longitud de onda* (propuesta originalmente por Wiener y Rosenblueth), que se define como la distancia que recorre el impulso eléctrico durante un periodo refractario, siendo el producto del período refractario por la velocidad de conducción. Para que la activación auricular persista (y que el frente de onda reexcite el miocardio) es necesario que el tiempo que el impulso tarda en recorrer el circuito sea superior al tiempo que el tejido tarda en recuperar su excitabilidad (es decir, superior al periodo refractario auricular). La coexistencia de periodos refractarios auriculares cortos y no uniformes y de una velocidad de conducción intra-auricular lenta, aumenta el número de circuitos de reentrada y facilita el automantenimiento de la fibrilación.

El concepto teórico de los rotores, producidos por ondas espirales, se desarrolló posteriormente por Krinsky y cols. en la URSS y por Winfree en Reino Unido (Krinsky, 1966; Winfree, 1987), concepto que se demostró en 1990 en músculo ventricular de ovejas por Davidenko y cols. (Davidenko y cols., 1990).

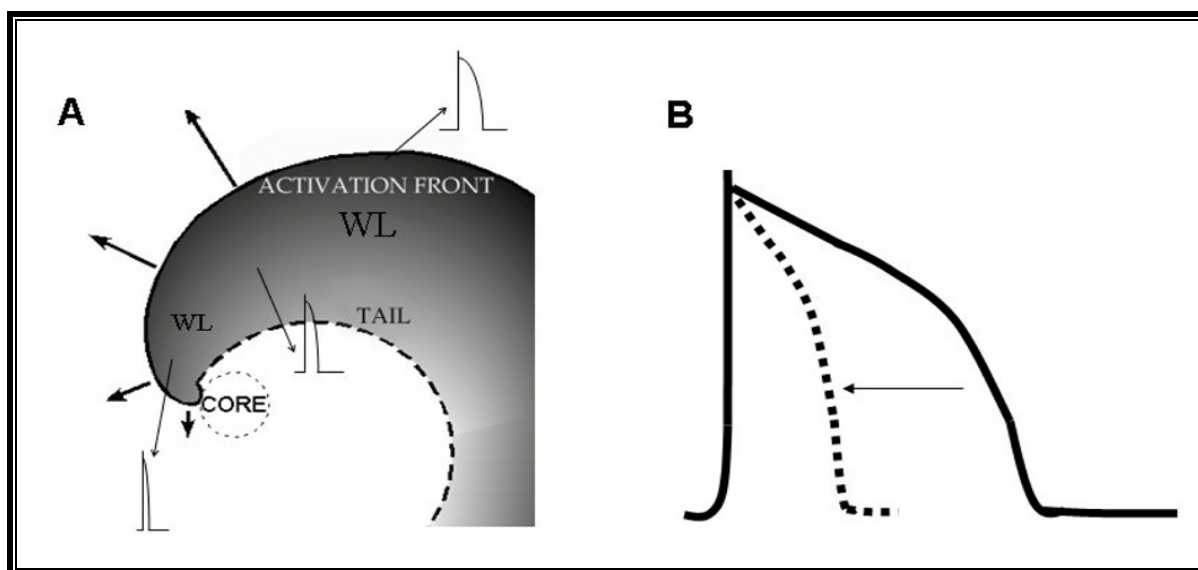
Se denomina *rotor* a la reentrada generada por frentes curvos que gira en torno a un eje vertical imaginario denominado *pivote* a gran velocidad. Los rotores generan frentes de excitación a frecuencias muy altas ( $>10$  Hz) que invaden el resto del corazón de forma desorganizada y que presentan conducción fibrilatoria. Los rotores parecen tener un papel fundamental en la fibrilación tanto auricular como ventricular.

La teoría de los rotores nace de la observación de reacciones químicas en medios excitables como la reacción de Belousov–Zhabotinsky, claro ejemplo de la termodinámica del no equilibrio (Belousov, 1958; Zhabotinsky, 1964), y está muy influenciada por hallazgos obtenidos en experimentos de imagen de flujos de  $[Ca^{2+}]_i$  en oocitos de *Xenopus* y por el resultado de simulaciones en modelos matemáticos (Schotten y cols., 2011). El músculo cardiaco es un medio excitable y como tal, comparte muchas de las características observadas en este tipo de medios, en cuanto a la propagación de ondas espirales. Al mismo tiempo que Allesie desarrollaba su concepto del *leading circle*, se desarrollaron experimentos químicos y modelos matemáticos que predecían que el corazón podría tener actividad eléctrica que rotase alrededor de un obstáculo funcional (Jalife, 2011). Aunque no universalmente aceptada, la

teoría de los rotores se ha convertido en una importante explicación mecanística de la fibrilación (Skanes, 2009; Voigt y cols., 2010; Narayan y cols., 2012).

La velocidad de conducción de un frente de excitación en el miocardio (*source/sink ratio*) depende de la relación entre la intensidad de la corriente despolarizante proporcionada por las células excitadas (*source*) y la corriente necesaria para la excitación de las células en reposo que el frente encuentra en su avance (*sink*). Haciendo una aproximación simplificada, en el caso de un frente lineal, cada célula excitada es responsable de la despolarización de “una única célula” por lo que este balance es equilibrado y la velocidad de conducción del frente es única y estable. Por el contrario, en el caso de un frente espiral, la curvatura del frente implica que el número de células en reposo que debe ser despolarizado por cada célula excitada aumenta, de modo que la carga de la célula excitada debe repartirse entre varias células para que el frente pueda avanzar. Esto implica que la velocidad de conducción disminuye y lo hará tanto más cuanto mayor sea la curvatura del frente. Por tanto, la velocidad de conducción de un frente espiral no es única, sino que disminuye progresivamente a medida que la curvatura del frente aumenta y nos acercamos al pivote del rotor. De hecho, el pivote del rotor se mantiene en reposo a pesar de que el tejido sea excitable (Fast y Kleber, 1997; Comtois y cols., 2005; Schotten y cols., 2011). Además, el pivote del rotor tiene un poderoso efecto electrotónico, por lo que tiende a provocar un acortamiento de la DPA a sus alrededores, lo que, junto con la baja velocidad de conducción, explica la corta longitud de onda en sus proximidades (Figura I.39) (Vaquero y cols., 2008; Schotten y cols., 2011; Jalife 2011).

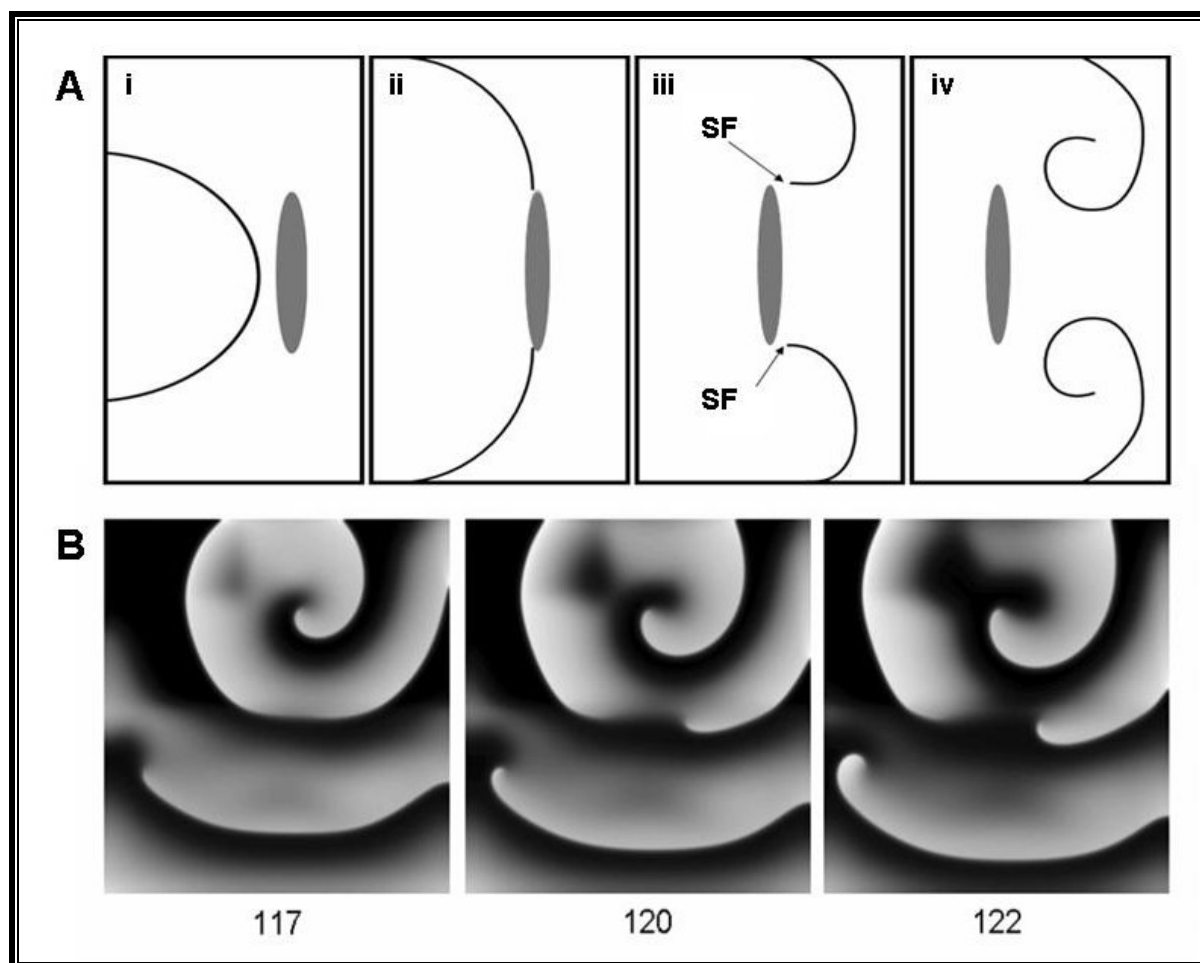
En consecuencia, un frente de onda espiral no se puede definir por una única longitud de onda, puesto que la velocidad de conducción y el período refractario no son iguales a lo largo de todo el frente, sino que aumentan continuamente desde el eje hasta la periferia (Beaumont y cols., 1998; Jalife, 2011).



**Figura I.39. Efectos electrotónicos del centro de rotación (*core*) en la velocidad de conducción, DPA y longitud de onda (WL).** (A) Durante la reentrada, el frente de onda adopta una forma de espiral con un incremento de la curvatura hacia el centro de rotación (*core*); su velocidad de conducción disminuye gradualmente hacia el centro (flechas gruesas), alcanzando un valor crítico en las inmediaciones del *core*. Como resultado se establece un desajuste entre la corriente despolarizante (principalmente  $I_{Na}$ ) suministrada por el frente de onda y la corriente electrotónica que es controlada principalmente por  $I_{K1}$  y necesaria para despolarizar las células en reposo dentro del centro de rotación, que permanece sin excitar. Como consecuencia, se genera un gradiente de voltaje entre el centro de rotación sin excitar y la periferia de las células excitadas, lo cual acorta la DPA (B), por lo tanto, la longitud de onda, velocidad de conducción y DPA cerca del *core* es mucho más pequeña que lejos del centro de rotación. [Adaptada de Vaquero y cols., 2008]

Los frentes de onda espirales procedentes de la formación del rotor se propagan a través del músculo cardíaco y chocan con obstáculos anatómicos o funcionales produciendo a su vez la fragmentación y formación de nuevos frentes de onda (Figura I.40) (Jalife y cols., 2002; Jalife y cols., 2004, Vaquero y cols., 2008). Éstas pueden acabar formando un nuevo rotor resultando en una constante fragmentación de ondas dependiente de la frecuencia (Berenfeld y cols., 2002; Jalife y cols., 2005).

Un rotor necesita espacio suficiente para girar (*elbow room*); cuando dos rotores chocan, el de mayor frecuencia absorberá al de menor frecuencia. Una vez iniciados, los rotores girarán a alta velocidad generando una turbulencia eléctrica conocida como conducción fibrilatoria. La distribución heterogénea de los canales iónicos en el miocardio hace que los rotores residan en áreas específicas cuya estructura, propiedades eléctricas y un período refractario corto promueva el acoplamiento del rotor (Jalife y cols., 1998).



**Figura I.40. Formación y fragmentación de rotores.** (A) Formación de un rotor. Una onda alcanza un obstáculo funcional (i) y empieza a circunvalarlo (ii). Si las condiciones de excitabilidad son las adecuadas, dos ondas hijas se separan del obstáculo, generando una singularidad de fase (SF) en cada extremo roto (iii). Las ondas formadas se curvan alrededor de las singularidades y empiezan a rotar (iv). (B) Modelo por ordenador de un rotor a altas frecuencias en una monocapa de miocitos ventriculares. Se aprecia como las ondas que emanan del rotor se fragmentan, iniciando una conducción fibrilatoria. Los números bajo cada fotograma indican milisegundos. [Adaptada de Vaquero y cols., 2008]

### 6.3. Los rotores en la génesis de la FA

Recientemente se ha publicado el primer estudio de mapeo espacio-temporal de la dinámica de la FA en 49 pacientes que iban a ser sometidos a ablación (Narayan y cols., 2012). Cuarenta y siete de los 49 pacientes presentaban rotores estables, y 11 de los 49 mostraban además focos automáticos que provocaban conducción fibrilatoria a su alrededor. Las tres cuartas partes de las fuentes fibrilatorias se localizaban en la AI donde se encontraban las frecuencias dominantes. Este resultado concuerda con los datos experimentales obtenidos mediante análisis espectral de alta resolución, que muestran que la pared posterior de la AI es la que alberga las fuentes con actividad espacio-temporalmente organizada más rápida.

(Mandapati y cols., 2000; Kalifa y cols., 2006). Los frentes de onda generados por estas fuentes adquieren patrones de conducción espacialmente complejos a medida que se acercan a la AD, y en conjunto, se manifiestan como un patrón de conducción fibrilatoria (Berenfeld y cols., 2002). Por tanto, el avance tecnológico ha permitido demostrar que en algunos tipos de fibrilación existe un patrón organizado en la actividad eléctrica que es cámara-dependiente y que no concuerda con la activación caótica propuesta por la teoría de los múltiples frentes de onda (Jalife, 2003). Diversos estudios en modelos animales de fibrilación sugieren que la AI es la aurícula principalmente implicada en el mantenimiento de la misma. Dos estudios en un modelo ovino de FA crónica y en un modelo canino de FA paroxística (Morillo y cols., 1995; Skanes y cols., 1998; Mansour y cols., 2001) demostraron que las frecuencias más rápidas ocurrían en la pared posterior de la AI y que existía un gradiente de frecuencia AI-AD. De hecho, la frecuencia dominante aumenta en el paso de la FA paroxística a persistente (Berenfeld y Jalife, 2014).

Un estudio en pacientes que iban a ser sometidos a ablación quirúrgica de las VP llevado a cabo por el grupo de Lazar y cols. (Lazar y cols., 2004) obtuvo las siguientes conclusiones: 1) que existe un gradiente de frecuencias AI-AD, en consonancia con los resultados en modelos experimentales y 2) que este gradiente desaparecía cuando la FA se mantenía durante más de un mes, lo que se atribuía a un aumento de la frecuencia de la AD hasta hacerse similar a la de la AI.

La razón por la cual la AI alberga las fuentes con mayores frecuencias todavía no se comprende del todo. Probablemente la causa sea multifactorial, por lo que es necesario el estudio de las propiedades específicas de la AI. Estas propiedades pueden resumirse en: a) la AI está expuesta a una mayor presión intracavitaria y por lo tanto sus paredes y músculos son más gruesos y heterogéneos que los de la AD; b) Las VP están localizadas en la AI; c) los bordes del fascículo septopulmonar de la pared posterior de la AI forman una barrera tridimensional efectiva que dificulta la propagación de los impulsos eléctricos prematuros generados en las VP (Hocini y cols., 2010). A medida que se desplazan por la aurícula, algunas de estas ondas pueden romperse, iniciando el proceso de reentrada; d) la rica inervación de la pared posterior de la AI, ya que en muchos pacientes, los paroxismos de fibrilación son iniciados por descargas simpáticas o vagales (Sarmast y cols., 2003; Shen y cols., 2012); e) los procesos de dilatación y estiramiento establecen las condiciones para la formación de los rotores primarios en la pared posterior de la AI (Kalifa y cols., 2003; Yamazaki y cols., 2009); f) la edad, la disfunción diastólica, el remodelado eléctrico y la



fibrosis establecen el sustrato ideal para la fibrilación (Swartz y cols., 2009; Lubitz y cols., 2010; Savelieva y cols., 2010); g) los PAs de la AI son más breves que los de la AD y, además, el remodelado eléctrico asociado a la FA acorta más la DPA de los PAs de la AI que la de los de la AD (González de la Fuente y cols., 2013). Todos estos procesos tienden a ser más marcados en la AI que en la AD (Swartz y cols., 2009).

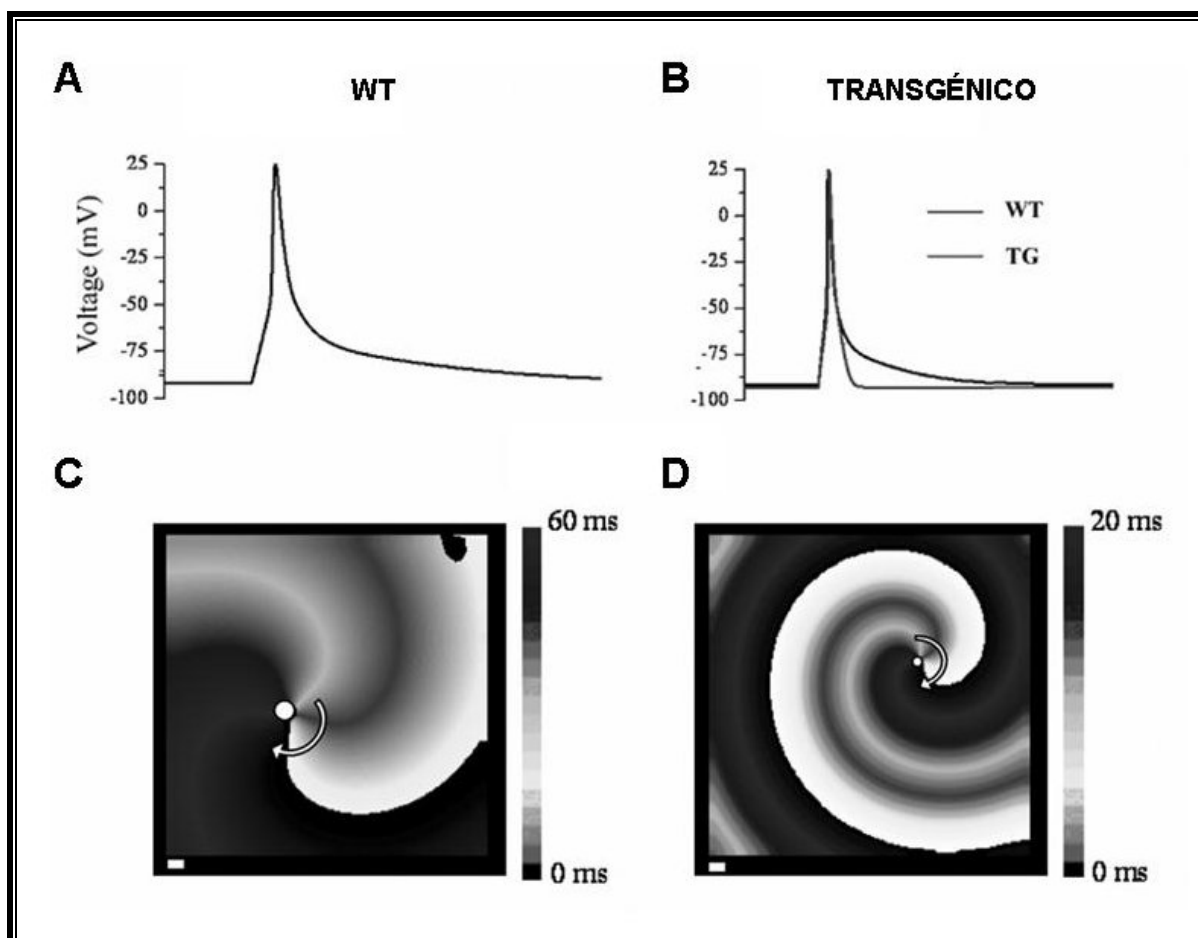
Sin embargo, no existían apenas datos en cuanto a las posibles diferencias en las propiedades electrofisiológicas entre los miocitos de ambas aurículas que pudieran explicar por qué las fuentes de origen de la FA y la mayor frecuencia de la actividad aparecen en la AI. Hasta la fecha, la mayor parte de los datos en lo que respecta a las diferencias en las características eléctricas entre ambas aurículas proviene de estudios con animales de experimentación. Un estudio en un modelo de ratón (Nygren y cols., 2004) determinó que la DPA era más corta en los miocitos de la AI que en los de la AD. Otro estudio en perros (Li y cols., 2001) demostró una mayor densidad de  $I_{Kr}$  en los miocitos de la AI que en los de la AD y no encontró diferencias significativas en ninguna de las demás corrientes estudiadas. En otro estudio en ratón (Lomax y cols., 2003) se comparaban las corrientes tiempo- y voltaje-dependientes de  $K^+$  de ambas aurículas, siendo mayores en la AI que en la AD, lo que justificaba que la DPA registrada fuera significativamente más corta en los miocitos de la AI que en los de la AD. En lo que respecta a los humanos, un estudio que comparaba la  $I_{K1}$  de la AD y la AI de pacientes con FA paroxística y en RS (Voigt y cols., 2010), concluyó que existe un gradiente AI-AD de densidad de  $I_{K1}$  que probablemente contribuye a la existencia de focos de actividad a altas frecuencias en la AI de los pacientes con FA paroxística, ya que un aumento en la densidad de la  $I_{K1}$  abrevia la DPA e hiperpolariza los miocitos auriculares, aumentando la disponibilidad de canales de  $Na^+$ , lo que facilita la estabilización y la aceleración de los rotores que mantienen la FA. En el año 2010 un estudio de nuestro grupo de trabajo comparó las corrientes repolarizantes de los miocitos de la AI con los de la AD de pacientes con FA crónica (Caballero y cols., 2010b). Los datos permitieron concluir que existen unas notables diferencias fisiológicas en las propiedades eléctricas de ambas aurículas (diferencias inter-auriculares) así como entre los miocitos de cada aurícula (intra-auriculares). La FA por su parte aumenta dicha disparidad creando un gradiente entre la AD y la AI en lo que respecta a la densidad de la  $I_{to}$ , mientras que abole el gradiente fisiológico AD-AI en lo que respecta a la  $I_{Kur}$ . A su vez, aumenta, multiplicando por casi 3, la densidad de la  $I_{Ks}$  lo que contribuye de forma crítica al acortamiento de la DPA en ambas aurículas.

#### 6.4. Papel de los canales iónicos

Muchas evidencias demuestran que la interacción entre la  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  controla la formación, estabilidad y frecuencia de los rotores. La  $I_{CaL}$  también parece jugar un papel en el control de la frecuencia de los rotores y en el paso de FV a taquicardia ventricular. Por lo que respecta a las corrientes de salida de  $K^+$  dependientes de voltaje parece importante el papel de la  $I_{Ks}$  en la estabilización de los rotores (Caballero y cols., 2010b).

El papel fundamental de la  $I_{K1}$  se ha demostrado tanto en modelos computacionales como en animales. La  $I_{K1}$  se encuentra aumentada en pacientes con FA, debido a un marcado aumento en la expresión de los canales Kir2.1, responsables de la generación de esta corriente y a un aumento en la probabilidad de apertura del canal, que podría explicarse por alteraciones en el grado de desfosforilación del canal (Michael y cols., 2009; Workman y cols., 2001; Dobrev y cols., 2001; Gaborit y cols., 2005; Voigt y cols., 2010). En modelos animales la inhibición de la  $I_{K1}$  con  $BaCl_2$  detenía o frenaba la FV (Warren y cols., 2003). Simulaciones computacionales para estudiar las consecuencias del aumento de la  $I_{K1}$  muestran rotores más rápidos que se desplazan menos y más estables (Pandit y cols., 2005). La estabilización de los rotores se debía a un acortamiento de la DPA y un aumento de la excitabilidad cardiaca por una mayor disponibilidad de la  $I_{Na}$ , producida a su vez por la hiperpolarización del potencial de membrana de reposo (Tabla I.9). Esto mismo se demostró posteriormente en ratones transgénicos donde la  $I_{K1}$  se sobreexpresaba: los rotores se mantenían extremadamente rápidos (50-60 Hz) durante más de 100 minutos, mientras que los rotores generados en los animales control tenían una frecuencia de giro mucho más lenta (10-20 Hz) y duraban menos (10 segundos) (Li y cols., 2004; Pandit y cols., 2005; Noujaim y cols., 2007b) (Figura I.41). Estos datos estimularon la búsqueda de fármacos que pudieran inhibir de forma selectiva la  $I_{K1}$ . Por ello, se describieron los determinantes moleculares de los fármacos capaces de unirse a los receptores farmacológicos presentes en los canales Kir2.1-2.3 (Gómez y cols., 2008; Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013).

El gradiente de frecuencias que existe entre la AD y la AI en la FA en presencia de acetilcolina se debe a distintas densidades de la  $I_{KACh}$  en ambas cámaras (Sarmast y cols., 2003). La activación de la  $I_{KACh}$  produce una aceleración y estabilización del rotor en FA aguda (Sarmast y cols., 2003; Atienza y cols., 2006) aunque en FA crónica, su papel es insignificante comparado con la  $I_{K1}$ .



**Figura I.41. Consecuencias de la sobreexpresión transgénica de  $I_{K1}$  en las características del PA, reentrada, longitud de onda y frecuencia.** (A) Simulación de un PA de un miocito ventricular de ratón WT. (B) Simulación de un PA de un miocito ventricular de ratón transgénico (TG) (gris) sobrepuesto encima de un PA de un miocito ventricular de ratón WT (negro), donde se observa una aceleración de la repolarización en la fase 3 en el PA transgénico respecto al WT. (C) Simulación de la reentrada capa de miocitos ventriculares de ratón WT y (D) transgénico. La sobreexpresión de  $I_{K1}$  reduce la extensión espacial del estado excitado (longitud de onda) e incrementa la frecuencia de rotación (WT, 13 Hz; TG, 40 Hz). [Adaptada de Vaquero y cols., 2008]

La corriente  $I_{Na}$  determina la excitabilidad cardíaca y el inicio del PA y es la principal corriente que conduce el frente de onda en su propagación normal, y también cuando se produce un rotor. El papel de la  $I_{Na}$  en la dinámica de los rotores se ha analizado directamente usando TTX (Mandapati y cols., 1998; Kneller y cols., 2005), o indirectamente elevando las concentraciones de  $K^+$  extracelular (Pandit y cols., 2010; Pandit y cols., 2011) o simulando condiciones de isquemia (que limita la disponibilidad de la corriente por despolarizar el Em) (Mandapati y cols., 1998). En todos los casos, la inhibición de la  $I_{Na}$  termina los rotores eliminando la fibrilación por tres mecanismos: 1) por un alargamiento del centro de rotación (*core*); 2) por pérdida de capacidad del rotor de anclarse a obstáculos funcionales, que termina por extinguirse en los límites; y 3) por una disminución del número de ondas secundarias que serían capaces de generar nuevos rotores (Kneller y cols., 2005) (Tabla I.9).

Corrientes	Acción	Frecuencia	VC	DPA	WL	Tamaño del "core"	Estabilidad
$I_{Na}$	Inhibición	↓	↓	↓	↓	↑	↑
$(I_{K1}; I_{K,Ach})$	Aumento	↑	↓ (cerca del "core")	↓	↓	↑	↑
$I_{Ca,L}$	Inhibición	↓↑	?	↓	↓	↓↑	↑
$I_{to}, I_{Kur}$	Inhibición	?	?	↑ ("plateau")	↑	?	↓?
$I_{Ks}$	Inhibición	↓=	?	↑	↑	?	↑
$I_{Kr}$	Inhibición	?	?	↑	↑	?	?

**Tabla I.9. Efectos de cada corriente iónica por separado en la dinámica de los rotores.** VC (velocidad de conducción), "core" (centro de rotación), WL (longitud de onda). [Adaptada de Vaquero y cols., 2008]

La concentración de calcio intracelular parece importante en el inicio de la actividad espontánea en TdP y en arritmias hereditarias como la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, que puede ser el inicio de rotores y fibrilación (Choi y cols., 2002; Cerrone y cols., 2007). Sin embargo el papel de la  $I_{Ca,L}$  es controvertido. Algunos autores muestran que el inhibición de la corriente con verapamilo produce una estabilización de los rotores por una mayor fragmentación de las ondas, y convierte la FV en taquicardia ventricular; mientras que otros estudios atribuyen estos efectos a la inhibición de la corriente  $I_{Kr}$ , también inhibida por el verapamilo a esas concentraciones (Zhang y cols., 1999; Noujaim y cols., 2007a; Noujaim y cols., 2007b) (Tabla I.9).

Por lo que respecta a las corrientes de salida de  $K^+$ , (Pandit y cols., 2005), el grupo de Jalife demostró que el rotor se terminaba inhibiendo selectivamente en un 90% la corriente auricular ultrarrápida de rectificación tardía  $I_{Kur}$  o la corriente transitoria de salida  $I_{to}$ , pero no los componentes rápido y lento de la corriente de salida de K con rectificación tardía  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$ . La prolongación del PA auricular producido por esta inhibición produjo la parada del rotor. Además a pesar de que la inhibición de la  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  no produjese el fin del rotor, la inhibición de ambas a la vez, sí. El hecho de que la inhibición de la  $I_{Kur}$  por sí solo sea capaz de terminar

el rotor es especialmente interesante ya que es una corriente específica de la aurícula y se puede evitar así los efectos proarrítmicos como las TdP asociadas a la inhibición de la  $I_{Kr}$  (Nattel, 1998; Nattel y cols., 1999) (Tabla I.9).

## 6.5. Futuro, implicaciones y perspectivas

Visto el grado de implicación de las distintas corrientes, especialmente la  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$ , en las arritmias fibrilatorias, parece fundamental encontrar fármacos antiarrítmicos eficaces que puedan modificar estas corrientes, y por tanto el funcionamiento de los rotores. La inhibición de estas corrientes puede tener efectos en la frecuencia y velocidad de los rotores.

Noujaim y cols. compararon los efectos de la cloroquina y la quinidina en el bloqueo de los rotores. Si bien ambos conseguían reducir la frecuencia de los rotores en ratones que sobreexpresaban  $I_{K1}$  (de 48 Hz a 28 Hz con la quinidina y a 4 Hz con la cloroquina) sólo la cloroquina era capaz de volver a ritmo sinusal en todos los casos estudiados. El éxito de la cloroquina para terminar la fibrilación se atribuye a una unión a Kir2.1 más estable a la parte citoplasmática. La cloroquina además parece inhibir preferentemente la  $I_{K1}$  ( $I_{K1} > I_{Kr} > I_{Na} > I_{CaL}$ ) (Sánchez-Chapula y cols., 2001). Sin embargo, hay evidencias de que la quinidina bloquea también la  $I_{Na}$ ,  $I_{CaL}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kur}$ , e  $I_{K1}$  (Clark y cols., 1995). En otros modelos como el de oveja, la cloroquina también redujo la frecuencia de los rotores y restauró el ritmo sinusal (Filgueiras-Rama y cols., 2012).

Los datos en distintos modelos animales sobre la eficacia de la inhibición de la  $I_{Na}$ , para producir el cese de los rotores (Comtois y cols., 2008) son controvertidos. Algunos sugieren que los bloqueantes de los canales de sodio son inefectivos porque reducen la longitud de onda disminuyendo la conducción (Nattel, 2002). De hecho, no solo no terminarían la fibrilación sino que la mantendrían (Asano y cols., 1997) o incluso convierten la fibrilación en taquicardia (Pandit y Jalife, 2013). Sin embargo, otros estudios demuestran su eficacia para prevenir y terminar la FA aún sin aumentar la longitud de onda (Wijffels y cols., 2000). El hecho cierto es que tanto flecainida como propafenona (los más potentes inhibidores de los canales de  $Na^+$ ) son los fármacos de elección para la cardioversión farmacológica de la FA de reciente comienzo en pacientes sin patología estructural por su seguridad y eficacia.

Otro estudio del grupo de Kodama muestra los beneficios antiarrítmicos de enfriar el miocardio ya que reduce la frecuencia y desestabiliza los rotores que acaban por extinguirse (Yamazaki y cols., 2012).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



El canal de sodio cardiaco humano está formado por la subunidad  $\alpha$  Nav1.5 unida a subunidades auxiliares (Nav $\beta$ ) y genera la corriente rápida de entrada de Na ( $I_{Na}$ ). La  $I_{Na}$  determina la excitabilidad y la conducción cardiacas. Por otro lado, la corriente de potasio con rectificación interna ( $I_{K1}$ ) es generada por homo- o heterotetrámeros de proteínas Kir2.x de las que existen tres clones en el miocardio humano: Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3. La  $I_{K1}$  determina la duración del potencial de acción cardiaco y del periodo refractario y establece el potencial de reposo del que depende la magnitud de la  $I_{Na}$ . La  $I_{K1}$ , por tanto, juega un papel crítico para controlar la refractariedad y la excitabilidad cardiacas. Recientemente se ha demostrado que existe una modulación recíproca positiva del nivel de expresión de los canales Nav1.5 y Kir2.1/Kir2.2. De esta forma el aumento en la expresión de canales Kir2.1 o Kir2.2 produce un aumento en la expresión de canales Nav1.5 y *viceversa*. Además, se ha demostrado que la presencia de canales Kir2.3 en los tetrámeros que generan la  $I_{K1}$  elimina la modulación recíproca positiva con los canales Nav1.5. Estos resultados tienen implicaciones fisiológicas ya que a nivel auricular humano, donde los canales Kir2.3 predominan (a diferencia de los ventrículos donde predomina Kir2.1), no hay modulación recíproca positiva entre  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$ . Por tanto, los canales Nav1.5 y Kir2.1/2.2 forman parte de un mismo canalosoma sólo en los miocitos ventriculares.

Existen numerosos síndromes arritmogénicos primarios hereditarios como el SBr, el SSE, el DCCP, y la FA familiar que son consecuencia de mutaciones en el gen *SCN5A*, que codifica el canal Nav1.5 humano, y que producen un déficit de función de dichos canales. Estas mutaciones codifican canales Nav1.5 que no trafican bien a la membrana o/y que tienen defectos de *gating*. El resultado es que los canales mutados o no son capaces de generar corriente o generan corrientes significativamente menores a las generadas por canales nativos. Algunas mutaciones producen, además, EDN, es decir que la presencia de un alelo/canal mutado disminuye la expresión/función de los canales nativos (WT). Dado que la proteína Nav1.5 es capaz *per se* de generar un canal funcional, el efecto dominante negativo producido por las proteínas mutadas sugiere que los canales Nav1.5 WT y mutados interaccionan entre sí.

En el momento actual se desconoce qué ocurre con la expresión de canales Kir2.1/Kir2.2, y por tanto con la densidad de la  $I_{K1}$  ventricular, en pacientes con mutaciones en *SCN5A* que generen canales con déficit de función. Se desconoce también si los canales Kir2.1/Kir2.2 son capaces de restaurar la expresión en membrana de los canales Nav1.5 mutados.



El **OBJETIVO GENERAL** que se persigue en la presente **TESIS DOCTORAL** es profundizar en el conocimiento de los mecanismos celulares y las repercusiones funcionales de la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.x. Para ello, utilizaremos como herramientas diversos mutantes del gen *SCN5A*, descritos en familias con síndromes arritmogénicos primarios, que generan canales Nav1.5 con déficit de función.

Los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** de la presente **TESIS DOCTORAL** serán:

- 1) Identificar si los canales Nav1.5 y los canales Kir2.1 interaccionan entre sí en sistemas de expresión heterólogos y en miocitos ventriculares de rata.
- 2) Analizar si el déficit de función de los mutantes de los canales Nav1.5 afecta a la densidad de la corriente generada por canales Kir2.x en ratones transgénicos, sistemas de transfección heterólogos, miocitos ventriculares de rata, y cardiomiocitos derivados de células humanas pluripotentes inducidas (hiPSC-CM); y en el caso que la afecte, compararemos los efectos producidos por los mutantes que no trafican hasta la membrana celular con los producidos por aquellos que trafican pero no generan corriente.
- 3) Analizar el efecto del silenciamiento de un alelo del gen *SCN5A* sobre la modulación recíproca positiva en ratones transgénicos.
- 4) Analizar las consecuencias de la presencia de mutantes del canal Nav1.5 con pérdida de función sobre las características de los potenciales de acción generados en hiPSC-CM.
- 5) Identificar el mecanismo de tráfico de canales Kir2.1-Nav1.5 por el cual se produce la modulación recíproca positiva.

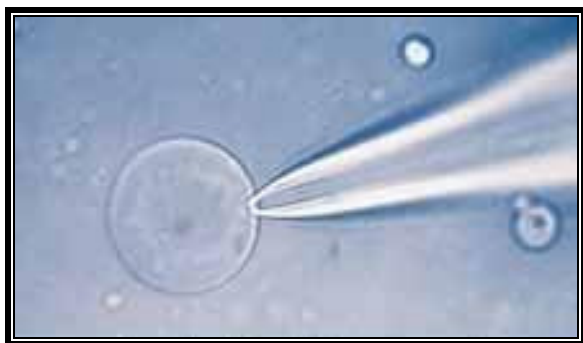
### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE EN PARCHE DE MEMBRANA (*PATCH-CLAMP*)

La técnica de fijación de voltaje comenzó a utilizarse en los años 80 para el registro de corrientes iónicas en células aisladas y se caracteriza por permitir mantener de forma estable el potencial de parte o de toda la membrana de la célula y registrar la corriente generada a través de los canales iónicos tras la aplicación de un pulso hiper o despolarizante (Hamill y cols., 1981). Esta técnica se basa en la formación de un sello de alta resistencia (un “gigasello” de  $\approx 2 \text{ G}\Omega$ ) entre la luz de una micropipeta de vidrio y la membrana de una célula (Figura III.1). La micropipeta se llena con una solución iónica (“solución interna”) cuya composición varía en función de la corriente objeto de estudio. A través de la micropipeta, se inyecta la corriente necesaria para fijar el  $E_m$  al valor deseado y, al mismo tiempo, se registra la corriente generada tras la aplicación de pulsos hiper o despolarizantes (Hamill y cols., 1981). La técnica de fijación de voltaje presenta diferentes configuraciones (Figura III.2):

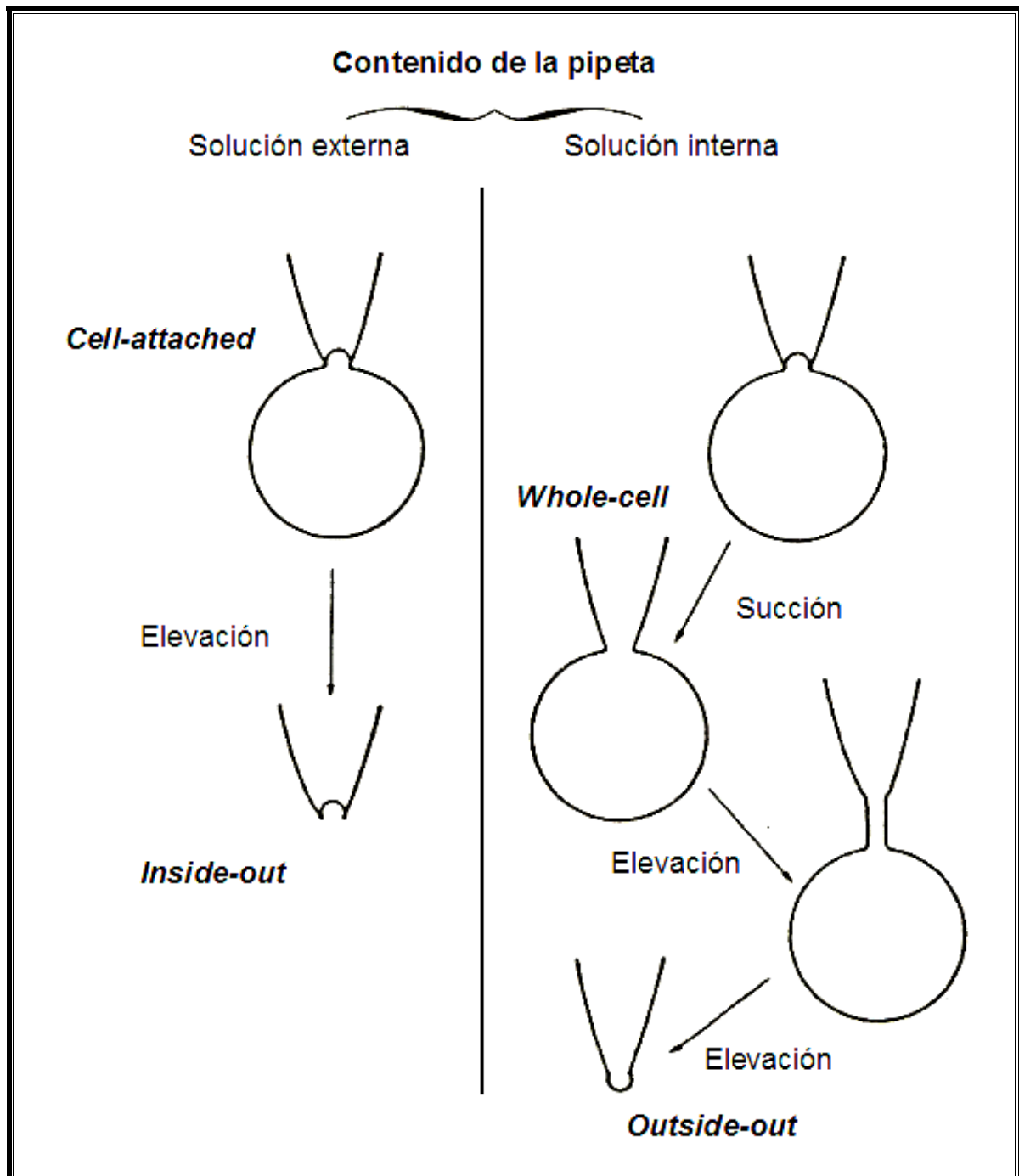
- a) Configuración de parche sobre célula entera, *cell-attached* u *on-cell patch*.
- b) Configuración de célula entera o *whole-cell patch*.
- c) Configuración de parche interior-fuera o *inside-out patch*.
- d) Configuración de parche exterior-fuera o *outside-out patch*.



**Figura III.1. Formación de un sello de alta resistencia.** Se muestran una micropipeta de vidrio y una célula CHO en el transcurso de la formación de un sello de alta resistencia o “gigasello”.

Una vez que se ha puesto en contacto la micropipeta con la superficie de la membrana celular, se aplica una ligera succión, con lo que la porción de la membrana incluida en la luz de la micropipeta se invagina y se forma el sello de alta resistencia. Ésta es la configuración de “parche de membrana sobre célula entera” (*cell-attached* u *on-cell patch*) que permite el registro de la corriente iónica unitaria o microscópica ( $i$ ), generada por la activación de un único canal (*single channel*) presente en el parche de membrana. Esta configuración presenta la ventaja de ser la más fisiológica de las cuatro mencionadas porque no modifica el medio intracelular y es la más adecuada para estudios que requieran la participación de todos los

sistemas celulares moduladores del canal iónico. Su principal desventaja es que no permite determinar el PR (un indicador de la situación fisiológica de la célula) ya que los valores a los que se fija son relativos al potencial de membrana de la célula. Este problema se minimiza perfundiendo las células con una solución externa despolarizante que mantiene el PR celular en 0 mV.



**Figura III.2. Configuraciones de la técnica de *patch-clamp*.** Diagrama que ilustra la metodología para conseguir las diferentes configuraciones de los sellos mediante la técnica de *patch-clamp*.

A partir de la configuración de parche de membrana sobre célula entera, y aplicando una ligera succión adicional, se puede romper la porción de membrana invaginada en la luz de la micropipeta y conseguir la configuración de “célula entera” (*whole-cell patch*). Tras la ruptura del parche de membrana, la solución interna de la micropipeta entra en contacto con el medio intracelular y, al ser mucho mayor su volumen en comparación con el volumen intracelular, se produce un recambio casi inmediato de la composición del mismo, es decir, se produce una diálisis intracelular. En estas condiciones es posible fijar el  $E_m$  al valor deseado y, tras la aplicación de los protocolos experimentales adecuados, registrar la corriente iónica resultante de la actividad de todos los canales presentes en la membrana celular o corriente macroscópica ( $I$ ). Esta configuración permite controlar y modificar a voluntad el medio intracelular, pero también diluye los mediadores intracelulares responsables de la regulación de los canales iónicos. Para minimizar este problema, la solución interna de la micropipeta se complementa con ATP y otros mediadores que, en condiciones fisiológicas, mantienen la función de los canales iónicos. Otra posibilidad para minimizar la dilución de los mediadores celulares es utilizar la configuración de “parche de membrana perforado”. Para ello, se añade a la solución interna un antibiótico (nistatina o anfotericina B) que, una vez que se ha formado el sello de alta resistencia, va formando pequeños poros en la membrana de la célula, permitiendo así el paso de iones monovalentes. De esta forma, la resistencia de acceso va disminuyendo paulatinamente, mientras que la amplitud de la corriente registrada va aumentando, hasta que ambos parámetros alcanzan valores estables al cabo de  $\approx 30$  minutos, momento en el se empieza a registrar la corriente iónica objeto de estudio.

Partiendo de la configuración de parche de membrana sobre célula entera (*cell-attached*), y elevando la célula del fondo del baño, se puede separar el parche de membrana incluido en la luz de la micropipeta del resto de la célula, quedando así el lado citosólico de la membrana expuesto al medio externo y el lado extracelular en contacto con la solución interna de la micropipeta. Ésta es la configuración de “parche de membrana interior-fuera” (*inside-out patch*).

La última configuración es la de “parche de membrana exterior-fuera” (*outside-out patch*) que se obtiene a partir de la configuración de célula entera (*whole-cell*). En esta configuración, la cara extracelular de la membrana es la que queda en contacto con la solución externa. Estas dos últimas configuraciones son las también llamadas “de parche escindido” y permiten el registro de corrientes unitarias y macroscópicas en macroparches. Ambas son adecuadas para el estudio del mecanismo de acción de fármacos o mediadores que actúen selectivamente sobre las superficies extra o intracelular de la membrana. Sin embargo,

presentan el inconveniente de que desligan los canales iónicos del contenido citosólico que modula su actividad.

En la presente Tesis Doctoral, la  $I_{Kir2.x}$ , la  $I_{K1}$ , la  $I_{Nav1.5}$  y la  $I_{Na}$  fueron registradas utilizando la configuración de célula entera (*whole-cell*) de la técnica de *patch-clamp*.

## 2. REGISTRO DE LA $I_{Kir2.x}$ E $I_{Nav1.5}$ EN SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGOS

Los experimentos presentados en esta Tesis Doctoral han sido realizados utilizando como sistema de expresión células de ovario de hámster chino (CHO). Son líneas celulares de mamífero en las cuales se transfectaba de forma transitoria el ADN complementario (ADNc) de los canales Kir2.x y Nav1.5 de humano (hKir2.x y hNav1.5) (WT y mutantes), así como proteínas accesorias.

### 2.1. Mutagénesis dirigida de los canales hKir2.x y hNav1.5

El vector de expresión con el ADNc del canal hKir2.1 WT fue proporcionado por el Dr. J. Jalife, de la Universidad de Michigan (Ann Arbor, MI, EEUU). El canal hKir2.1 WT fue clonado de tejido humano, amplificado mediante PCR e incorporado al vector pcDNA3.1 para su expresión en líneas celulares de mamífero (Priori y cols., 2005).

El vector de expresión con el ADNc del canal hKir2.3 fue proporcionado por el Dr. J. A. Sánchez-Chapula, de la Universidad de Colima (Colima, México). El canal fue amplificado por PCR e incorporado al vector pcDNA3.1 para su expresión en líneas celulares de mamífero (Rodríguez-Menchaca y cols., 2008).

El vector de expresión pCMV6-XL4 con el ADNc del canal hKir2.2 fue adquirido en la empresa Origene (USA).

Los vectores de expresión con el ADNc de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio cardiaco (Nav1.5) y la subunidad  $\beta 1$  fueron proporcionados por la Dra. Connie R. Bezzina (Universidad de Amsterdam, Holanda). Las subunidades fueron amplificadas por PCR e incorporadas al vector pCGI para su expresión en líneas celulares de mamífero (Casini y cols., 2007; Watanabe y cols., 2008).

Todas las mutaciones de los canales hKir2.x y hNav1.5 (Tabla III.1) se realizaron con el kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU) y fueron

confirmadas mediante la secuenciación completa y en ambas direcciones de la región codificante de las dos cadenas de ADN.

Proteína	Mutaciones	Objetivo
Kir2.1	p.E377A-E379A, p.Δ314-315	Estudio del tráfico del canal a membrana
Nav1.5	p.D1690N, p.G1748D, p.D1816VfsX7, p.R104W, p.R878C, p.H558R-D1690N	Reparación patofisiológica de canales mutantes asociados a SBr

**Tabla III.1. Mutantes de Kir2.x y Nav1.5 que se diseñaron en nuestro laboratorio para la realización de la presente Tesis Doctoral.** Las mutaciones separadas por “–” están contenidas en el mismo plásmido.

## 2.2. Cultivo y transfección de los canales hKir2.x y hNav1.5 en células CHO

Para el cultivo de las células CHO se emplearon placas de 60 mm de diámetro con medio Ham-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Dolz-Gaitón y cols., 2013; Gómez y cols., 2014). Todas las líneas celulares se mantenían a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se pasaron cada 4-5 días mediante un breve tratamiento con tripsina (0.5 mg/ml) (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Dolz-Gaitón y cols., 2013; Gómez y cols., 2014).

Para el estudio electrofisiológico, las células CHO se transfectaron de forma transitoria con el vector de expresión que contenía el gen del canal hKir2.x (WT o mutante) (1.6 µg) solo o junto con el canal hNav1.5 (WT o mutante) y hNavβ1 (1.6 µg) (Nav1.5-β) más el ADNc que codifica para el antígeno CD8 (0.5 µg).

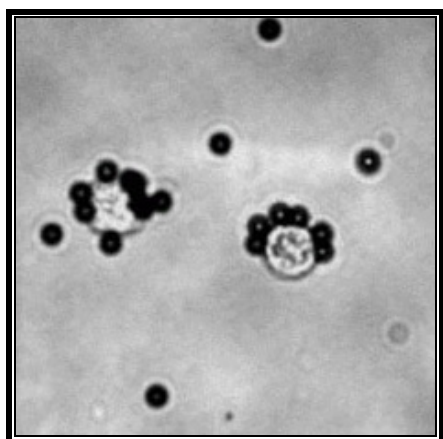
Las células CHO representan un buen modelo para el estudio de canales de K<sup>+</sup>, ya que no presentan ninguna corriente de este tipo (Yu y Kerchner, 1998). Sin embargo, sí presentan una pequeña proporción de canales de Na<sup>+</sup> endógenos (Lalik y cols., 1993), aunque la amplitud de las corrientes generadas a través de los mismos es demasiado pequeña para interferir en el registro de las corrientes de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> generadas por los canales hKir2.x y hNav1.5.

Para la transfección se utilizó el método del XtremeGENE HP (Roche Diagnostics, Barcelona, España). Este método de transfección consiste en la incubación de una mezcla de



XtremeGENE HP, del vector o vectores de expresión con el gen del canal y del ADNc del antígeno de superficie CD8 expresado en el vector EBOpcD Leu-2 (0.5  $\mu$ g), en presencia de medio de cultivo Ham-F12 sin suero y sin antibiótico. El XtremeGENE HP está compuesto por una mezcla de lípidos que propicia que el ADNc se incorpore a las células y permitir así la expresión en la membrana de los canales objeto de estudio. Con estos vectores de expresión, una mezcla con una relación de 3 volúmenes de XtremeGENE HP (en  $\mu$ L) por cada volumen de ADNc (en  $\mu$ g) se demostró como la mejor para obtener la mayor cantidad de células transfectadas. Tras incubar la mezcla durante 30 minutos, ésta se añadía a las células CHO mantenidas en medio Ham-F12 con suero y con antibiótico, permitiendo que el ADNc adherido al XtremeGENE HP se introdujese en las células. Transcurridas 48 horas, tiempo durante el cual se producía la transcripción del ADNc y la expresión en la membrana de los canales, las células se barrían de la placa con rascadores de goma, procedimiento mediante el cual la mayoría de las células permanecen intactas. Tras dejar reposar la suspensión de células durante 1 hora a temperatura ambiente (22-24°C), se comenzaban los experimentos electrofisiológicos durante las 12 horas siguientes (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Dolz-Gaitón y cols., 2013; Gómez y cols., 2014).

Para la selección de las células que habían incorporado los vectores, éstas se incubaron con una solución de microesferas de poliestireno unidas a anticuerpos anti-CD8 (Dynabeads M-450; Dynal, Oslo, Noruega). Los anticuerpos anti-CD8 se unen a las células que presentan en su membrana el antígeno de superficie CD8, células que, en la mayoría de los casos, también presentan el canal objeto de estudio (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Dolz-Gaitón y cols., 2013; Gómez y cols., 2014). De este modo, para la realización de los experimentos, las células se seleccionaban mediante su observación al microscopio por la presencia en la membrana de las microesferas de poliestireno (Figura III.3).



**Figura III.3. Identificación de las células CHO que expresan el antígeno CD8 en su membrana.** Células CHO transfectadas con el plásmido EBO-pcD leu2 identificadas mediante anticuerpos anti-CD8 unidos a microesferas de poliestireno (DynaBeads M-450).

### 2.3. Silenciamiento de GRASP55 en células CHO

Hace casi 20 años se describió por primera vez el uso de *dsRNAs* (*double stranded RNA*, ARN de doble cadena) como *RNAi* (*RNA interference*, ARN de interferencia) para el silenciamiento de un determinado gen en *Caenorhabditis elegans* (Fire y cols., 1998). Poco después se observó que los *dsRNAs* eran procesados a *siRNAs* (*small interferente RNAs*), que son los ARNs de doble cadena de unos 25 nucleótidos de longitud, realmente encargados de inhibir la expresión de genes (Hamilton y cols., 1999; Zamore y cols., 2000). Posteriormente, se demostró que se podían silenciar genes de células en cultivo mediante la transfección de *siRNAs* sintéticos con agentes lipídicos (Elbashir y cols., 2002). En ese mismo año se utilizaron por primera vez *shRNAs* (*short hairpin RNAs*), que son dúplex de *siRNAs* unidos por una horquilla y sintetizados por la propia célula como una sola hebra de ARN a partir de ADNc introducido en un plásmido, para inhibir la expresión de genes (Yu y cols., 2002). Dado que los miocitos tienen un bajo índice de transfección al utilizar agentes lipídicos, el silenciamiento de genes en estas células se suele llevar a cabo mediante la infección con virus que codifican para *shRNAs*, mientras que el silenciamiento de genes en líneas celulares como CHO se puede hacer perfectamente transfectando *siRNAs* sintéticos con LipofectAMINE 2000. Por lo tanto, para el silenciamiento de GRASP55 en células CHO, se transfectaron diferentes *siRNAs* obtenidos a partir de la secuencia de GRASP55 (Acc. no. XM\_007611693.1) (Tabla III.2), a una concentración final en placa de 100 nM (GRASP55) con LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, USA). Como control de silenciamiento se utilizó un *siRNA* control negativo universal de Sigma (SIC001) a 100 nM. Los experimentos de *western blot* demostraron que las proteínas se silenciaban en una proporción mayor al 70% a las 24 horas de la transfección. Por tanto, los experimentos de electrofisiología se llevaron a cabo 24 horas después de la transfección.

Proteína	siRNA	Secuencia sentido ( 5'- 3')	Secuencia antisentido ( 5'- 3')
GRASP55	siRNA1 Gorasp2	CGACACUGUCAUGAAUGAGUCUGAA	UUCAGACUCAUUAUGACAGUGUCG
	siRNA2 Gorasp2	ACACUGACAACUGUCGAGAAGUGAU	AUCACUUCUCGACAGUUGUCAGUGU

Tabla III.2. Secuencias de los *siRNAs* utilizados para silenciar GRASP55 (Gorasp2) en células CHO.

## 2.4. Técnicas de registro en sistemas de expresión heterólogos

Para el registro de  $I_{Kir2.x}$  y  $I_{Nav1.5}$  en células CHO se colocaba una alícuota de la suspensión de las células transfectadas en una cámara de 0.5 ml montada sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon TS100; Nikon Co., Tokio, Japón). Después de asentarse en el fondo de la cámara, las células fueron perfundidas con solución externa (ver composición más adelante) a una velocidad de flujo de  $\approx 1$  ml/minuto. Las corrientes se registraron a temperatura ambiente. Para la obtención de los registros se utilizó un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). La generación de protocolos, la adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron llevados a cabo mediante el uso del software PCLAMP 9.0 y de sus aplicaciones CLAMPEX y CLAMPFIT (Molecular Devices). Las micropipetas empleadas en los registros fueron obtenidas a partir de tubos capilares de borosilicato de 1.0 y 0.5 mm de diámetro exterior e interior, respectivamente (GD1; Narishige Co. Ltd., Tokio, Japón), utilizando un estirador horizontal de micropipetas programable (P-2000; Sutter Instruments Co., Novato, CA, EEUU). Posteriormente, las puntas de las micropipetas fueron pulidas en una microforja (MF-83; Narishige) hasta alcanzar el tamaño deseado. Para asegurar la calidad de la fijación del voltaje, la resistencia de las micropipetas utilizadas, una vez que se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era inferior a  $3.5 \text{ M}\Omega$  para el registro de  $I_{Kir2.x}$  o inferior a  $1.5 \text{ M}\Omega$  para el de  $I_{Nav1.5}$ . Los artefactos de corriente capacitativa generados al aplicar pulsos simétricos de 10 mV fueron registrados a 50 kHz, filtrados a 10 kHz y posteriormente utilizados para el cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula. Posteriormente se optimizaron la capacitancia y las resistencias en serie; en la mayor parte de los casos se obtuvo una compensación en torno al 80%. La resistencia de acceso no compensada y la capacitancia de las células CHO fue de  $1.9 \pm 0.1 \text{ M}\Omega$ , y  $10.6 \pm 0.85 \text{ pF}$ , respectivamente ( $n=717$ ), mientras que la amplitud máxima media de la  $I_{Kir2.1}$ ,  $I_{Kir2.2}$ ,  $I_{Kir2.3}$ , e  $I_{Nav1.5}$  a -120 mV fueron de  $-1.2 \pm 0.1$  ( $n=31$ ),  $-0.7 \pm 0.1$  ( $n=25$ ),  $-0.3 \pm 0.03 \text{ nA}$  ( $n=21$ ), y  $-1.7 \pm 0.2 \text{ nA}$ , respectivamente. Por tanto, en nuestras condiciones experimentales los errores de voltaje debidos a las resistencias en serie fueron mínimos ( $< 5 \text{ mV}$ ). Además la baja capacitancia permitió un rápido control en la fijación de voltaje.

## 2.5. Registro de la $I_{Kir2.x}$ e $I_{Nav1.5}$ : Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la corriente macroscópica generada por los canales hKir2.x así como la generada por los canales hNav1.5 en células CHO, la solución externa contenía (en mM): NaCl 136, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, y glucosa 10 (ajustada a pH 7.4 con NaOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 80, KCl 42, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5, y EGTA 5 (ajustada a pH 7.2 con KOH) para el registro de  $I_{Kir2.x}$  (*liquid junction potential* (LJP)=-13.2 mV) o NaF 10, CsF 110, CsCl 20, HEPES 10, y EGTA 10 (ajustada a pH 7.35 con CsOH) para el registro de  $I_{Nav1.5}$ . Los voltajes se corrigieron según el LJP, o diferencia de potencial que se genera en función de las diferentes concentraciones de iones en las soluciones extra e intracelular del experimento (Neher, 1992; Gómez y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a). Además para minimizar los cambios en las propiedades tiempo y voltaje dependientes de la corriente  $I_{Nav1.5}$ , los registros se realizaron después de 20 minutos de establecer la configuración de célula entera. En estas condiciones, la amplitud de la corriente y la dependencia de voltaje de la activación e inactivación se mantenían estables durante el transcurso del experimento. Los valores del punto medio ( $V_h$ ) y la pendiente ( $k$ ) de las curvas conductancia-voltaje para  $I_{Nav1.5}$  registrados en células CHO fueron  $42.7 \pm 1.6$  mV and  $5.2 \pm 0.3$ , respectivamente, mientras que los de las curvas de inactivación fueron  $-80.9 \pm 1.1$  mV y  $6.0 \pm 0.3$ , respectivamente. Cabe destacar que la coexpresión de los canales Kir2.1 no modificaba la dependencia de voltaje de la activación e inactivación.

El protocolo para el registro de la  $I_{Kir2.x}$  en las células transfectadas consistía en la aplicación de pulsos de 250 ms en incrementos de 10 mV entre -120 mV y +20 mV. El potencial de fijación se mantuvo a -60 mV. Para la construcción de las relaciones corriente-voltaje (I-V) se representaba la amplitud de la corriente medida al final del pulso en función del potencial del pulso aplicado.

El protocolo para el registro de la  $I_{Nav1.5}$  en las células transfectadas consistía en la aplicación de pulsos de 50 ms en incrementos de 5 mV entre -80 mV y +50 mV. El potencial de fijación se mantuvo a -120 mV. Para la construcción de las relaciones corriente-voltaje (I-V) se representaba la amplitud de la corriente medida en el pico máximo en función del potencial del pulso aplicado.

Para determinar el  $E_{Na}$  (potencial de inversión para el  $Na^+$ ) las relaciones densidad de corriente-voltaje fueron ajustadas a la fórmula:

$$I_{Na} = (E_m - E_{Na}) * G_{max} * (1 + \exp[(E_m - V_h)/k])^{-1} \quad (III.1)$$

donde  $I_{Na}$  es el pico de corriente en cada pulso al potencial deseado  $E_m$ ,  $G_{max}$  la conductancia máxima.,  $V_h$  es el punto medio de la curva y  $k$  el valor de la pendiente. La dependencia de voltaje de la activación se estudió construyendo las curvas conductancia – voltaje (curvas de activación). Cada curva de activación se construyó representando el pico de conductancia normalizado en función del potencial de membrana. La conductancia ( $G$ ) fue calculada mediante la ecuación:

$$G = I_{Na}/(E_m - E_{Na}) \quad (III.2)$$

donde  $G$  es la conductancia a un  $E_m$  dado,  $I_{Na}$  representa el pico máximo de corriente al  $E_m$  y  $E_{Na}$  es el potencial de inversión calculado mediante la ecuación III.1.

La amplitud de la corriente se normalizó dividiendo entre el valor de la capacitancia de cada célula para obtener la densidad de corriente.

La  $I_{Kir2.x}$  y la  $I_{Nav1.5}$  se registraron utilizando una frecuencia de muestreo de 4 y 50 kHz, respectivamente, se filtraron a la mitad de la frecuencia de muestreo y se guardaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis. Los datos se analizaron usando el software pCLAMP (Molecular Devices).

### 3. REGISTRO DE LA $I_{K1}$ E $I_{Na}$ EN MIOCITOS VENTRICULARES DE RATA ADULTA

#### 3.1. Disociación enzimática de miocitos ventriculares de rata

El procedimiento mediante el cual se obtuvieron los corazones de rata está conforme con el *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH Publication No. 85-23, Revisado en 1996) y aprobado por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Complutense de Madrid y de la Universidad de Michigan.

Los miocitos ventriculares se aislaron de corazones de cinco ratas macho adultas de la raza Sprague–Dawley (con pesos de entre 225 y 250 gramos) mediante disociación enzimática siguiendo un protocolo utilizado por el grupo del Dr. José Jalife (Milstein y cols.,

2012) y que fue adaptado a partir de estudios anteriores (Haworth y cols., 1980; Westfall y cols., 1997; Caballero y cols., 2004). Las ratas fueron heparinizadas (1.000 U/kg i.p.) y anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). Cuando las ratas no respondían a estímulos, se les extirpó el corazón que se conectó rápidamente a un sistema de perfusión de Langendorff a través de una cánula insertada en la aorta. El corazón se perfundió inicialmente con una solución *Tyrode* carente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $0 \text{ Ca}^{2+}$ ) (cuya composición era en mM: NaCl 112, KCl 10,  $\text{MgCl}_2$  1.2, HEPES 10, taurina 20, y glucosa 10; ajustada a pH 7.4 con NaOH) durante 10 minutos con un flujo constante de 8 mL/minuto. Luego, el corazón se perfundió durante otros 15 minutos con la misma solución suplementada con 0.35 mg/mL colagenasa tipo II (Worthington) y albúmina al 1%. Las soluciones perfundidas estaban continuamente oxigenadas (95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ) y con una temperatura fija de 37°C. Tras ello, los corazones se descolgaron del aparato de Langendorff y los ventrículos se cortaron en pequeños fragmentos y se mantuvieron en agitación suave con una solución *Tyrode* suplementada con 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 33  $\mu\text{M}$  blebistatina y 2% de albúmina, para dispersar las células. Las células obtenidas se dejaron reposar durante 30 minutos y se resuspendieron en Medio 199 (M199, Sigma) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Invitrogen, USA), 1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  y 100 U/mL de penicilina y 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomycin.

### 3.2. Cultivo e infección de miocitos ventriculares de rata

Debido a la baja eficiencia (10%) en la transfección de plásmidos en miocitos con agentes lipídicos tales como XtremeGENE HP o LipofectAMINE 2000, se decidió utilizar construcciones adenovirales para la expresión de las proteínas de interés. La utilización de estos vectores permiten obtener una eficiencia en la infección cercana al 90% (Kirshenbaum y cols., 1993; Marian y cols., 1995; Djurovic y cols., 2004; Louch y cols., 2011; Lang y cols., 2015).

Los miocitos ventriculares de rata adulta se sembraron en cubre objetos estériles previamente tratados con laminina 0,04 mg/ml (Sigma) y se mantuvieron en medio M199 durante dos horas. Transcurrido este tiempo, se infectaron con las construcciones adenovirales que codificaban para el canal Nav1.5 WT (Ad-Nav1.5 WT) o los mutantes de Nav1.5 p.G1748D (Ad-G1748D), p.D1690N (Ad-D1690N) o p.D1816VfsX7 (Ad-D1816fs), empaquetados por encargo en la Unidad de Producción de Vectores (UPV, CBATEG) de la Universidad Autónoma de Barcelona. Como control, los miocitos se infectaron con la

construcción adenoviral que codificaba para GFP (*Green Fluorescent Protein*) únicamente (Ad-GFP), amablemente proporcionada por el grupo de investigación del Dr. José Jalife.

Para los miocitos ventriculares de rata adulta, la multiplicidad de infección (MOI) fue de 75, 200, 150, 120 y 350 para el Ad-GFP, Ad-Nav1.5 WT, Ad-D1690N, Ad-G1758D y Ad-D1816fs, respectivamente. Se utilizó el mismo stock adenoviral en todos los experimentos para eliminar variables que afectaran a los resultados. Las corrientes se registraron 48 horas después de la infección. Los miocitos infectados con las construcciones virales se identificaban mediante la visualización de la fluorescencia emitida por GFP (Figura III.5) utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000S, Nikon).



**Figura III.4. Miocitos ventriculares de rata cultivados en nuestro laboratorio e infectados con Ad-GFP 48h. (A)** Miocitos ventricular de rata visto en campo claro con objetivo x40. **(B)** Misma imagen que en A pero utilizando un filtro de FITC (*fluorescein-isothiocyanate*) para comprobar que la célula ha sido infectada con el Ad-GFP. **(C)** Miocitos ventriculares de rata infectados con Ad-GFP y observados con el objetivo x20.

### 3.3. Técnicas de registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ ventriculares de rata

El registro de las corrientes nativas en miocitos ventriculares de rata se realizaba de manera similar a como se ha explicado en el apartado 2.4 para el registro de corrientes en sistemas de expresión heterólogos. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente. Las micropipetas empleadas en estos registros fueron obtenidas como se ha descrito en el apartado 2.4. Su resistencia, una vez rellena con la solución interna y sumergida en la solución externa, era de 2-4 M $\Omega$ . El cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula se realizó como se ha descrito previamente para los sistemas de expresión heterólogos. En los miocitos ventriculares de rata infectados con el Ad-GFP los valores de la resistencia de acceso y la capacitancia celular fueron  $2.0 \pm 0.8$  M $\Omega$  y  $83.6 \pm 4.2$  pF ( $n=36$ ), respectivamente, mientras que la amplitud media máxima (a -100 mV) de la  $I_{K1}$  y el pico de la amplitud máxima de  $I_{Na}$  fueron  $-1932 \pm 112$  y  $-1039 \pm 107$  pA, respectivamente.

Los voltajes se corrigieron según el LJP (Neher, 1992; Gómez y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a). El LJP entre la pipeta y la solución externa fue de -12 mV para los registros de  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de rata.

Como se ha mencionado para sistemas de expresión heterólogos, para minimizar los cambios en las propiedades tiempo y voltaje dependientes de la corriente  $I_{Na}$ , los registros se realizaron después de 20 minutos de establecer la configuración de célula entera. En estas condiciones, la amplitud de la corriente y la dependencia de voltaje de la activación e inactivación se mantenían estables durante el transcurso del experimento.

### 3.4. Registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ ventriculares de rata: Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de rata, la solución externa contenía (en mM): NaCl 120, KCl 20,  $CaCl_2$  1,  $MgCl_2$  1, HEPES 10, 4-aminopiridina 2, glucosa 10, y glibenclamida (10  $\mu$ M) (ajustada a pH 7.4 con NaOH). A dicha solución se le añadía nifedipino (1  $\mu$ M) y atropina (1  $\mu$ M) para inhibir  $I_{Ca,L}$  e  $I_{K,ACh}$ , respectivamente. Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era igual a la utilizada para miocitos auriculares humanos (en mM): K-aspartato 80, KCl 42,  $KH_2PO_4$  10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5 y EGTA 5 (ajustada a pH 7.2 con KOH).

En algunos experimentos, y para confirmar que la corriente registrada era  $I_{K1}$  se perfundía con una solución externa a la que se añadía  $BaCl_2$  (100  $\mu$ M). En estas condiciones, se consideraba  $I_{K1}$  como la corriente sensible a  $BaCl_2$  y su amplitud a los diferentes voltajes estudiados se calculaba como la diferencia entre la corriente total, registrada con la solución externa carente de  $BaCl_2$ , y la corriente registrada en presencia de  $BaCl_2$ .

Para el registro de la  $I_{Na}$  en miocitos ventriculares de rata, la solución externa contenía (en mM): NaCl 4, CsCl 133.5,  $CaCl_2$  1,  $MgCl_2$  1,  $CdCl_2$  0.1, HEPES 20, y glucosa 10 (ajustada a pH 7.4 con CsOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): NaF 10, CsF 110, CsCl 20, HEPES 10, y EGTA 10 (ajustada a pH 7.35 con CsOH).

El protocolo para registrar la  $I_{K1}$  ventricular de rata consistió en pulsos de 250 ms en incrementos de 10 mV (desde un potencial de fijación de -40 mV) a potenciales entre -100 y +30 mV. Las relaciones I-V se obtuvieron representando la amplitud de la corriente medida al final del pulso en función del voltaje aplicado, en intervalos de 10 mV.



El protocolo para registrar la  $I_{Na}$  ventricular de rata consistió en pulsos de 50 ms en incrementos de 5 mV (desde un potencial de fijación de -120 mV) a potenciales entre -100 y +30 mV.

En todos los experimentos, la amplitud de la corriente se normalizó a la capacitancia de la membrana para obtener la densidad de corriente.

La  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  se registraron utilizando una frecuencia de muestreo de 4 y 50 kHz respectivamente, se filtraron a la mitad de la frecuencia de muestreo y se guardaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis. Los datos se analizaron usando el software pCLAMP (Molecular Devices).

#### 4. REGISTRO DE LA $I_{K1}$ E $I_{Na}$ EN MIOCITOS VENTRICULARES DE RATÓN

##### 4.1. Disociación enzimática de miocitos ventriculares de ratón

El procedimiento mediante el cual se obtuvieron los corazones de ratón cumple con los principios descritos en la Guía para el cuidado y el manejo de animales de experimentación publicado por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH Publication No. 85-23, Revisado en 1996) y fue aprobado por los Comités de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Complutense de Madrid y de la Universidad de Michigan.

En este grupo de experimentos se utilizaron 4 grupos de ratones macho de la cepa C57BL/6 de la misma estirpe y de la misma edad (3-4 meses): ratones control o WT (N=3), ratones que sobreexpresaban el gen *KCNJ2* de forma heterocigota (*KCNJ2OE<sup>+/-</sup>*) (N=3) (Li y cols., 2004), ratones *knockout* heterocigotos para el gen *SCN5A* (*SCN5A<sup>+/-</sup>*) (N=4) (Papadatos y cols., 2002) y ratones resultantes del cruzamiento de los dos grupos anteriores (*KCNJ2OE<sup>+/-</sup>*-*SCN5A<sup>+/-</sup>*) (N=3).

Los miocitos ventriculares se obtuvieron mediante disociación enzimática siguiendo un protocolo utilizado por el grupo dirigido por el Dr. José Jalife (Milstein y cols., 2012) y que fue adaptado a partir de lo descrito en estudios anteriores (Cerrone y cols., 2007). Los ratones fueron heparinizados (1.000 U/kg i.p.) y anestesiados con Avertin (tribromoetanol; 125–250 mg/kg i.p.). Cuando los ratones no respondían a estímulos, se les abrió el torso y se extrajo el corazón. A continuación se conectó a un sistema Langendorff a través de la aorta y se perfundió retrógradamente con distintas soluciones oxigenadas y mantenidas a 37°C. En primer lugar, se perfundió con una solución carente de  $Ca^{2+}$  (0  $Ca^{2+}$ ) cuya composición era (en mM): NaCl 113, KCl 4.7,  $MgSO_4$  1.2,  $Na_2HPO_4$  0.6,  $KH_2PO_4$  0.6,  $KHCO_3$  10,  $NaHCO_3$

12, HEPES 10, 2,3-butanediona monoxima 10, taurina 30, y glucosa 5.5. A continuación el corazón se perfundió durante 15 minutos con la misma solución suplementada con 0.25 mg/mL colagenasa tipo II (Worthington), 0.14 mg/mL tripsina, y 12.5  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . Tras la digestión enzimática, se cortaron los ventrículos en pequeños fragmentos ( $\approx 1 \text{ mm}^3$ ) que se agitaron durante 10 minutos en la solución 0  $\text{Ca}^{2+}$  inicial. Los miocitos resultantes se centrifugaron y se resuspendieron en un tampón con 10% FBS y 12.5  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , en el cual se iba incrementando el  $\text{Ca}^{2+}$  progresivamente hasta llegar a 1 mM. Los miocitos se usaron para registros electrofisiológicos en las 8 horas siguientes.

#### 4.2. Técnicas de registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ ventriculares de ratón

Los registros de las corrientes se realizaron a temperatura ambiente, utilizando la técnica de patch-clamp en configuración de célula entera y un amplificador MultiClamp 700B (Molecular Devices, USA). Las micropipetas empleadas en estos registros fueron obtenidas como se ha descrito en el apartado 2.4. Su resistencia, una vez se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era inferior a 3.5 M $\Omega$ . En todos los experimentos, la resistencia de acceso se compensaba automáticamente utilizando la utilidad de compensación de la resistencia de acceso del amplificador, alcanzándose a una compensación de alrededor el 80%. El cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula se realizó como se ha descrito previamente para los sistemas de expresión heterólogos. Los valores de la resistencia de acceso sin compensar y la capacitancia celular fueron  $2.0 \pm 0.3 \text{ M}\Omega$ , y  $155.4 \pm 8.5 \text{ pF}$  ( $n=65$ ) respectivamente. En nuestras condiciones experimentales los errores de voltaje debidos a las resistencias en serie fueron mínimos ( $<5 \text{ mV}$ ).

Además para minimizar los cambios en las propiedades tiempo y voltaje dependientes de la corriente  $I_{Na}$ , los registros se realizaron después de 20 minutos de establecer la configuración de célula entera. En estas condiciones, la amplitud de la corriente y la dependencia de voltaje de la activación e inactivación se mantenían estables durante el transcurso del experimento.

#### 4.3. Registro de la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ : Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la  $I_{Na}$  en miocitos ventriculares de ratón, la solución externa contenía (en mM): NaCl 5,  $\text{MgCl}_2$  1,  $\text{CaCl}_2$  1,  $\text{CdCl}_2$  0.1, CsCl 132.5, HEPES 20, y glucosa 11

(ajustada a pH 7.35 con CsOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): NaCl 5, CsF 135, EGTA 10, MgATP 5, y HEPES 5 (ajustada a pH 7.2 con CsOH).

El protocolo para registrar la  $I_{Na}$  en miocitos ventriculares de ratón consistió en pulsos de 200 ms desde un potencial de fijación de -120 mV a potenciales entre -100 y +30 mV en incrementos de 5 mV.

Para el registro de la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de ratón, la solución externa contenía (en mM): NaCl 143.4,  $NaH_2PO_4$  0.4,  $MgCl_2$  1, KCl 10,  $CaCl_2$  1, HEPES 15, glucosa 5 y nifedipino (1  $\mu$ M) (ajustada a pH 7.35 con NaOH). En algunos experimentos, se añadía  $BaCl_2$  (1 mM) a la solución externa para aislar la  $I_{K1}$ . En estas condiciones, se midió la  $I_{K1}$  como la corriente sensible a  $BaCl_2$ . Su amplitud a los diferentes voltajes estudiados se calculaba como la diferencia entre la corriente total, registrada con la solución externa carente de  $BaCl_2$ , y la corriente registrada en presencia de  $BaCl_2$ . Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (mM): KCl 148,  $MgCl_2$  1, EGTA 5, HEPES 5, creatina 2, ATP 5, y fosfocreatina 5 (ajustada a pH 7.2 con KOH).

El protocolo para registrar la  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de ratón consistió en pulsos de 400 ms desde un potencial de fijación de -50 mV a potenciales entre -120 y +30 mV en incrementos de 10 mV.

En todos los experimentos, la amplitud de la corriente se normalizó a la capacitancia de la membrana para obtener la densidad de corriente.

La  $I_{K1}$  y la  $I_{Na}$  se registraron utilizando una frecuencia de muestreo de 4 y 50 kHz respectivamente, se filtraron a la mitad de la frecuencia de muestreo y se guardaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis. Los datos se analizaron usando el software pCLAMP (Molecular Devices).

## **5. REGISTRO DE LA $I_{K1}$ , $I_{Na}$ Y PAs EN MIOCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS HUMANAS (hiPSC).**

### **5.1. Obtención de los miocitos derivados de hiPSC**

Los miocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC-CM) se obtuvieron a partir de la línea DF19-9-11T que fue originalmente diferenciada a partir de fibroblastos de donantes sanos. Para la desdiferenciación de los fibroblastos y la obtención

de las hiPSC se usaron vectores episomales que no se integran en el genoma (para evitar mutaciones). Tras eliminar el episoma, las hiPSC estaban libres de vectores y de secuencias de transgenes (Yu y cols., 2009). El uso de hiPSC y los miocitos (hiPSC-CM) que derivan de ellos se aprobó por el Comité *Human Pluripotent Stem Cell Research Oversight* (HPSCRO) de la Universidad de Michigan (USA).

## 5.2. Diferenciación, cultivo e infección de los miocitos derivados de hiPSC

Las hiPSC obtenidas a partir de la línea DF19-9-11T se sembraron en cubre objetos de polidimetilsiloxano (PDMS) estériles previamente cubiertos con matrigel (500 µg/mL; BD Biosciences, San Jose, CA) para la diferenciación cardíaca dirigida, como se ha descrito previamente (Herron y cols., 2016). El medio para la diferenciación (EB-20) contenía 80% DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)/F12, 0.1 mM β-mercaptoetanol, 20% FBS, y 10 µM blebistatina. El protocolo de diferenciación se ha descrito previamente (Caballero y cols., 2017) y consiste en la incubación durante 7 días de distintos fármacos (*small molecule protocol*) que favorecen la diferenciación de las hiPSC a miocitos cardíacos. Treinta días después del inicio del proceso de diferenciación, las células se purificaron usando el kit comercial Mitenyi Biotec (*PSC-Derived Cardiomyocyte Isolation Kit, human*) y se cultivaron de nuevo en cubre objetos de PDMS cubiertos con matrigel (Herron y cols., 2016). Una semana después, las células ya estaban maduras y listas para ser infectadas con las construcciones adenovirales que codificaban para el canal Nav1.5 WT o el mutante p.G1748D que se han descrito en el apartado 3.2.

Para los miocitos derivados de hiPSC, la MOI fue de 10 para Ad-Nav1.5 y 10 para Ad-p.G1748D. Se utilizó el mismo stock adenoviral en todos los experimentos para eliminar variables que afectaran a los resultados. Las corrientes se registraron 48 horas después de la infección. Los miocitos infectados con las construcciones virales se identificaron mediante la fluorescencia emitida por el GFP utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000S, Nikon).

## 5.3. Técnicas de registro de la $I_{K1}$ , $I_{Na}$ y PAs en hiPSC-CM

Tanto las corrientes y los potenciales de acción se registraron 72 horas después de la infección (Nikon Eclipse Ti, Nikon). Los registros de corrientes y de potenciales de acción se hicieron a temperatura ambiente y a 35°C respectivamente, utilizando la técnica de patch-

clamp en configuración de célula entera y un amplificador MultiClamp 700B (Molecular Devices, USA). Las micropipetas empleadas en estos registros fueron obtenidas como se ha descrito en el apartado 2.4. Su resistencia, una vez se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era inferior a 3.5 M $\Omega$  para el registro de las corrientes y entre 4 y 6 M $\Omega$  para el registro de PAs. El cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula se realizó como se ha descrito previamente para los sistemas de expresión heterólogos. En los miocitos derivados de hiPSC los valores de la resistencia de acceso y la capacitancia celular fueron de  $2.7 \pm 0.3$  pF y  $70.2 \pm 6.9$  M $\Omega$ , respectivamente (n=48). El resto de condiciones experimentales utilizadas para el registro de la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  fueron idénticas a las descritas en apartados anteriores.

#### 5.4. Registro de la $I_{K1}$ , $I_{Na}$ y PAs: Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la  $I_{Na}$  en miocitos derivados de hiPSC, la solución externa contenía (en mM): NaCl 50, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1.8, CdCl<sub>2</sub> 0.1, CsCl 102.5, HEPES 20, y glucosa 11 (ajustada a pH 7.35 con CsOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): NaCl 5, CsF 135, EGTA 10, Mg-ATP 5, y HEPES 5 (ajustada a pH 7.2 con CsOH).

El protocolo para registrar la  $I_{Na}$  de miocitos derivados de hiPSC consistió en pulsos de 100 ms desde un potencial de fijación de -160 mV a potenciales entre -80 y +45 mV en incrementos de 5 mV.

Para el registro de la  $I_{K1}$  en miocitos derivados de hiPSC, la solución externa contenía (en mM): NaCl 148, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1.8, KCl 5.4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4, HEPES 15, glucosa 11 y nifedipino (5  $\mu$ M) para inhibir  $I_{Ca,L}$  (ajustada a pH 7.35 con NaOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (mM): KCl 148, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA 5, Creatina 2, Mg-ATP 5, fosfocreatina 5, y HEPES 5 (ajustada a pH 7.2 con KOH).

El protocolo para registrar la  $I_{K1}$  en miocitos derivados de hiPSC consistió en pulsos de 500 ms desde un potencial de fijación de -50 mV a potenciales entre -120 y +40 mV en incrementos de 10 mV. Las relaciones I-V se obtuvieron representando la amplitud de la corriente medida al final del pulso en función del potencial del pulso aplicado en función del voltaje aplicado.

El LJP entre la pipeta y la solución externa fue de -4.3 mV para los registros de  $I_{K1}$  en miocitos derivados de hiPSC.

En todos los experimentos, la amplitud de la corriente se normalizó a la capacitancia de la membrana para obtener la densidad de corriente.

Tanto la  $I_{K1}$  como la  $I_{Na}$  se registraron utilizando una frecuencia de muestreo de 4 y 50 kHz respectivamente, se filtraron a la mitad de la frecuencia de muestreo y se guardaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis. Los datos se analizaron usando el software pCLAMP (Molecular Devices).

Para el registro de los PAs, la solución externa contenía (mM): NaCl 148,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.4,  $\text{MgCl}_2$  1, glucosa 5.5, KCl 5.4, HEPES 15, y  $\text{CaCl}_2$  1.8 (ajustada a pH 7.4 con NaOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (mM): KCl 150,  $\text{K}_2\text{ATP}$  4.46, fosfocreatina 5, HEPES 5, EGTA 1,  $\text{MgCl}_2$  1, y ácido 2 $\beta$ -hydroxybutírico (ajustada a pH 7.2 con KOH) (Herron y cols., 2016).

Las células se estimularon a 0.5-2 Hz utilizando pulsos cuadrados con una amplitud de 30-50 pA y una duración de 4 ms, generados por un simulador digital DS8000 (World Precision Instruments, USA). En todos los casos se midieron los siguientes parámetros que caracterizan a los PAs cardíacos: PR, amplitud del PA, velocidad máxima de despolarización ( $V_{\text{max}}$ ), y la duración del potencial medida al 20%, 50% o 90% de la repolarización.

## 6. EXPERIMENTOS DE *WESTERN BLOT*

### 6.1. Extracción proteica de células CHO transfectadas

Las células CHO se transfectaron utilizando los procedimientos descritos en el apartado 2.1. Tras 24 horas (para los estudios de silenciamiento), las células se lavaron con PBS frío (3x) y se lisaron incubándolas con tampón *radioimmunoprecipitation assay* (tampón RIPA) frío, cuya composición era 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% desoxicolato y una mezcla de inhibidores de proteasas P2714 (Sigma), durante 30 minutos a 4°C para dejar actuar el tampón. Los núcleos y restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se utilizó inmediatamente para evitar ciclos de congelación/descongelación y posible degradación proteica.

## 6.2. Cuantificación de proteínas

Para cuantificar la proteína, se utilizó el método BCA (Thermo Scientific, Pierce) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ácido bicinonínico (BCA), es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (reacción de Biuret).

Básicamente consistió en preparar distintas diluciones de las muestras junto con los reactivos A y B del kit, y, tras 30 minutos a 37°C, leer la absorbancia a 562 nm. Con los datos obtenidos se construyó una curva patrón con las distintas concentraciones conocidas de BSA frente a los valores obtenidos de la absorbancia, que permitió cuantificar la cantidad de proteína presente en las muestras objeto de estudio mediante extrapolación.

## 6.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida, transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección

Las muestras se cargaron en geles comerciales TGX *stain free*<sup>TM</sup> (Bio-Rad, USA) del 10% y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970) a voltaje de 200 y 300 V. Una vez finalizada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia rápida (Bio-Rad, USA) durante 15 minutos a 25 V del gel a una membrana de nitrocelulosa.

A continuación, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios a la membrana, ésta se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con PBS suplementado con Tween al 0,05% (PBS-T) y leche desnatada liofilizada al 5% para, seguidamente, incubar con el anticuerpo primario (diluido en tampón de bloqueo con leche desnatada al 5%) a 4°C y agitación constante durante toda la noche. Tras lavar la membrana 3 veces x 7 minutos con tampón PBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (1:10000, Jackson ImmunoResearch, USA) para la detección de las proteínas en los lisados. Finalizada la incubación de 1 hora con el anticuerpo secundario, se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS-T 0,05% para, a continuación, detectar las proteínas mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL, General Electric Healthcare, USA). Se utilizó un equipo de imagen Chemidoc MP System y el software Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad, USA) para el análisis densitométrico de las imágenes. Para asegurar la carga equitativa de proteína en los *western blot* de silenciamiento de GRASP55 en células CHO, se determinó la expresión de GAPDH.

## 7. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

### 7.1. Experimentos de inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica se hizo en miocitos ventriculares de rata disociados enzimáticamente obtenidos de 3 ratas adultas siguiendo el procedimiento que utiliza el laboratorio dirigido por el Dr. Jalife (Milstein y cols., 2012). Las células se fijaron en PBS al 4% de paraformaldehído (PFA), y se bloquearon en PBS con suero de burro (Abcam, Reino Unido) al 10% y Triton-X100 (NDS, detergente neutro soluble) al 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente. La incubación con los anticuerpos primarios (ver concentraciones en apartado 9.1) se realizó en PBS con suero de burro al 10% y NDS al 5% a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, tras lavar el exceso de anticuerpo primario (3 lavados de 10 minutos con PBS al 0.1% de NDS), las células se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (ver apartado 9.1) en PBS con suero de burro al 3% y NDS al 5%. Los cubreobjetos se lavaron finalmente en PBS-T (3 lavados de 10 minutos) y PBS (1 lavado de 10 minutos) en oscuridad y montados en porta objetos con medio de montaje ProLong Gold Antifade (Invitrogen, USA) para preservar la fluorescencia de la muestra durante más tiempo. Las preparaciones se analizaron por microscopía confocal, con el microscopio Nikon A1R (Nikon Instruments Inc, Melville, NY) mediante la luz proveniente de una lámpara de mercurio a través de un objetivo de 100 aumentos, empleando un filtro para rodamina (TRITC, *tetramethylrhodamine isothiocyanate*) tanto en el caso de Cy3 como de Alexa 594, y un filtro FITC en el caso de Cy2 y de Alexa 488. Para verificar la especificidad de la reacción inmunocitoquímica se realizaron controles en ausencia de anticuerpos primarios. El tratamiento y análisis de las imágenes se realizó mediante el programa informático Image J (NIH, *National Institutes of Health*, USA), asignando el color rojo a la imagen tomada con el filtro TRITC y el color verde a la imagen adquirida con el filtro FITC.

Para detectar el sitio de retención intracelular de los mutantes del canal Nav1.5, se utilizaron células COS-7 crecidas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se transfectaron transitoriamente con los canales mutantes p.D1690N-GFP o p.G1748D-GFP (0.5 ug) y con el marcador del Golgi mCherry-Golgi-7 (Addgene) (0.5 ug) mediante Fugene XtremeGENE como ya hemos descrito para las células CHO durante 24 horas a 37°C. Posteriormente las células se tripsinizaron e incubaron en cubreobjetos a baja densidad (100.000 células/placa p35). Tras



24 horas, los cubreobjetos se transfirieron a placas multipocillos, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron en 2% PFA/PBS (2 minutos) seguido de metanol frío (-20°C, 10 minutos). Para detectar la calnexina, las células se bloquearon con 0.2M de Glicina pH 8.0 durante 5 minutos, y 0.5% BSA/PBS durante 30 minutos. La incubación con el anticuerpo primario anti-Calnexina-CT 1:200 (StressMarq) diluido en PBS se hizo toda la noche a 4°C o durante 2 horas a 37°C. Tras tres lavados, las células se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-rabbit Alexa-647 1:500 (ThermoFischer) en PBS, y 5 minutos con 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) 1:5.000 (Merck). Los cubreobjetos se montaron en porta objetos con medio de montaje Mowiol. El microscopio de fluorescencia utilizado fue Zeiss AxioVert 200M equipado con los objetivos 40X Plan Neofluar NA 1.3 o 63X PlanApo NA 1.4, fuente de luz CoolLED pE-4000, cámara Coolsnap FX mono y el software MetaMorph. El tratamiento y análisis de las imágenes se realizó mediante el programa informático Image J (NIH, *National Institutes of Health*, USA).

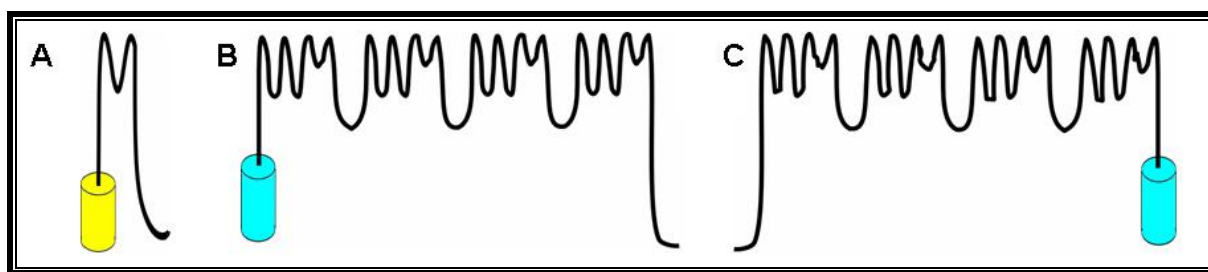
## 7.2. Determinación de la expresión de Kir2.1 y Nav1.5 en membrana

Para confirmar que la cotransfección de estos dos canales conllevaba un aumento de su expresión en la membrana celular respecto a la expresión en membrana al transfectar cada canal individualmente, se decidió construir varias quimeras de los canales unidas a proteínas fluorescentes y así poder analizar los resultados mediante microscopía confocal.

### 7.2.1. Construcción de quimeras

El canal Kir2.1 se subclonó entre los sitios de corte de las enzimas de restricción EcoRI y XhoI del vector pcDNA3.1(+), para posteriormente subclonar cp173Venus, una proteína fluorescente amarilla (YFP) mejorada y modificada por permutación circular en el aminoácido 173 (Rekas y cols., 2002; Nagai y cols., 2004), entre los sitios NheI y AflIII del mismo plásmido, y así obtener la quimera cp173Venus-Kir2.1. La secuencia que conectaba el fluoróforo cp173Venus y la proteína Kir2.1, de 93 pares de bases, era YPLSLVPSSDPQSSVVEFDSKAEALESPA EA. En este caso la proteína fluorescente fue insertada antes del extremo N-terminal de Kir2.1, Figura III.6.A. Por otro lado el canal Nav1.5 se subclonó en el sitio de restricción HindIII de pcDNA3.1(+) y posteriormente se insertó mTq2 (*monomeric Turquoise 2*) (Goedhart y cols., 2012), una variante más brillante de la proteína fluorescente cian (CFP) entre los sitios NheI y AflIII o entre NotI y XbaI en el

mismo plásmido obteniendo, por un lado, la quimera mTq2-Nav1.5 (proteína fluorescente insertada antes del extremo N-terminal de Nav1.5, Figura III.5.B) y por otro, Nav1.5-mTq2 (proteína fluorescente insertada después del extremo C-terminal de Nav1.5, Figura III.5.C). La secuencia que conectaba el fluoróforo mTq2 y el extremo N-terminal de la proteína Nav1.5, de 18 pares de bases, era YLKLT; mientras que la secuencia conectora entre el extremo C-terminal de la proteína Nav1.5 y el fluoróforo mTq2 era WKAWYRARIHASSVVEFCRYPAQWRPLET. Todas las construcciones fueron confirmadas por secuenciación. Es importante destacar que la expresión de los tres canales en células CHO daba lugar a corrientes iónicas con idénticas características que las generadas por los canales sin las sondas fluorescentes.



**Figura III.5. Quimeras canal-proteína fluorescente.** (A) cp173Venus-Kir2.1 (cp173Venus, en amarillo, insertado antes del extremo N-terminal de Kir2.1). (B) mTq2-Nav1.5 (mTq2, en cian, insertado antes del extremo N-terminal de Nav1.5). (C) Nav1.5-mTq2 (mTq2, en cian, insertado después del extremo C-terminal de Nav1.5).

### 7.2.2 Cultivo, transfección y fijación de células HEK293

Tanto el cultivo, transfección, fijación y posterior análisis mediante microscopía confocal fueron llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Francisco Javier Díez Guerra (CBMSO, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Cantoblanco, UAM). Las células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293) se cultivaron en placas de 60 mm de diámetro con medio DMEM complementado con suero fetal bovino al 10% y una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin). Esta línea celular se mantuvo a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se pasaron cada 4-5 días mediante un breve tratamiento con tripsina (0.5 mg/ml) (Caballero y cols., 2010a; Amorós y cols., 2013; Gómez y cols., 2014).

Para el estudio mediante microscopía confocal de la expresión de los canales Kir2.1 y Nav1.5 en la membrana plasmática, las células HEK293 se transfectaron de forma transitoria con el vector de expresión que contenía el gen de cp173Venus-Kir2.1 (1.6 µg) solo o junto

con el canal Nav1.5-mTq2 o mTq2-Nav1.5 (1.6  $\mu$ g) (ver apartado 6.3.1). Para realizar la transfección se utilizó el método del XtremeGENE HP (Roche Diagnostics, Barcelona, España), procedimiento que ha sido descrito en detalle en el apartado 2.2. Pasadas 24 horas después de la transfección, las células se levantaron mediante un leve tratamiento con tripsina (0.5 mg/ml) y se sembraron entre 100000 - 250000 células en cada cubreobjetos previamente tratados con poli-lisina (0.01 mg/ml). En estas condiciones, se incubaron las células a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% otras 24 horas más antes de llevar a cabo la fijación.

La fijación de las células se llevó a cabo 48 horas después de la transfección con PFA al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente (Broussard y cols., 2013). Una vez fijadas las células se lavaron los cubreobjetos 3 veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos utilizando medio de montaje ProLong Gold Antifade (Invitrogen, USA). Las muestras se guardaron a 4°C en oscuridad para su posterior análisis mediante microscopía confocal.

### 7.2.3 Microscopía confocal y análisis de imagen

Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal, con un microscopio de barrido láser confocal y multifotón LSM710 (Zeiss, Alemania) a través de objetivos de inmersión de 40 y 63 aumentos, empleando un filtro para mTq2 (CFP) ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 405 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  = 454-568 nm) y otro filtro para cp173Venus (YFP) ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 514 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  = 516-621 nm). Las líneas láser fueron proporcionadas mediante un diodo a 405 nm y mediante una lámpara de argón a 514nm para mTq2 y cp173Venus, respectivamente. El tratamiento y análisis de las imágenes se realizó mediante el programa informático Image J, asignando el color cian a mTq2-Nav1.5 y Nav1.5-mTq2, y el amarillo a cp173Venus-Kir2.1.

## 8. RECUPERACIÓN DE FLUORESCENCIA POSTERIOR AL FOTO-BLANQUEAMIENTO (FRAP)

El método FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) consiste en el análisis de la recuperación, tras su extinción mediante luz láser (*Photobleaching*), de la señal fluorescente emitida por un fluoróforo unido a una proteína de interés. La señal fluorescente irá recuperándose de forma gradual a medida que nuevas proteínas unidas a fluoróforos intactos vayan llegando a la región en la cual se ha anulado la señal fluorescente de las proteínas que residían en ella. Por tanto, este tipo de experimentos permite analizar la

dinámica intracelular de proteínas. Para ello, se transfectaron células COS-7 de forma transitoria con el vector de expresión que contenía el ADNc que codifica para el canal Nav1.5 unido al fluoróforo mTq2 en el N-terminal (0.5  $\mu$ g) o el canal Kir2.1 unido al fluoróforo cp173Venus en el N-terminal (0.5  $\mu$ g), o bien ambos canales juntos (0.5:0.5  $\mu$ g). Para la transfección se utilizó el método del XtremeGENE HP (Roche Diagnostics, Barcelona, España) tal y como se describió para las células CHO (ver apartado 2.2). Pasadas 48 horas, se sembraron 50.000 células en placas p-36 MatTek Corporation Glass Bottom Cultured Dished® (especiales para la pletina del microscopio) al menos 5 horas antes de su la visualización *in vivo* y a una temperatura (37°C) y humedad controladas (Okolab). Una vez asentadas las células, se cambió el medio de cultivo por solución salina de Hank's cuya composición era (en mM): NaCl 137, KCl 5.3, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.35, D-glucosa 0.6% (w/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.45, CaCl<sub>2</sub> 1.25, MgSO<sub>4</sub> 0.8, NaHCO<sub>3</sub> 1, Piruvato Sódico 1 y Hepes 10, ajustada a pH 7.3. Los experimentos se realizaron en un microscopio confocal A1R+ de alta velocidad de adquisición y sensibilidad (Nikon) acoplado a un microscopio invertido modelo Eclipse Ti-E con un objetivo de 40x/1.3 con *perfect focus system* y se usó el software NIS Elements.

En cada célula analizada se seleccionaron dos regiones de interés (ROI) cilíndricas de 5  $\mu$ m de diámetro y de 1  $\mu$ m de espesor. Las ROIs estaban debidamente separadas entre sí y colocadas en el espacio citoplasmático evitando incluir el núcleo y la membrana citoplasmática. En una célula próxima se seleccionaba una ROI de idénticas características en la que no se extinguía la fluorescencia y servía para el control de la disminución espontánea de la fluorescencia con el tiempo, disminución que luego se sustraía en las células problema. El protocolo utilizado consistió en la obtención de 6 imágenes cada 10 segundos como control previo a la extinción. Para el aclarado, se usó un láser diodo que emitía a una longitud de onda de 445 nm para extinguir el fluoróforo mTq2 o a 514 nm para extinguir el fluoróforo cp173Venus a una intensidad del 25% de la intensidad máxima, en 7 iteraciones alternativas de iluminación, durante un total de 28 segundos. Tras el aclarado, se tomó una imagen cada 10 segundos durante 15 minutos para determinar la cinética y la intensidad de la recuperación de fluorescencia. Para el análisis, los valores medios de intensidad de las ROIs se obtuvieron con el programa Fiji/Image J (Schindelin y cols., 2012). La sustracción de la señal de fluorescencia basal (fondo), y la normalización con la ROI de referencia se hicieron mediante el programa EasyFRAP (Matlab) ([ccl.med.upatras.gr/easyfrap.html](http://ccl.med.upatras.gr/easyfrap.html)) (Rapsomaniki y cols., 2012). Para el análisis de la cinética e intensidad (fracción móvil) de la recuperación de la fluorescencia se utilizó el programa Origin (OriginLab Corporation, USA). Se ajustó una

función monoexponencial a los valores normalizados de intensidad de fluorescencia en función del tiempo, lo que permitió obtener la constante de tiempo de recuperación de la fluorescencia en cada condición experimental. La fracción móvil se calculó como la media de la intensidad de fluorescencia registrada durante el último minuto de cada experimento.

## **9. ANTICUERPOS, COMPUESTOS Y OTROS PLÁSMIDOS**

### **9.1. Anticuerpos**

En el análisis de la expresión de GRASP55 por *western blot* se utilizó la GAPDH como control de carga y para ello se determinó la expresión de la GAPDH usando el anticuerpo anti-GAPDH de ratón (1:100000, Sigma). El anticuerpo anti-GRASP55 de conejo (1:200, Abcam, Reino Unido) se usó como anticuerpo primario para la detección específica de la expresión proteica en células control o con GRASP55 silenciado. El anticuerpo Anti-IgG de ratón unido a HRP (1:10000, Jackson ImmunoResearch), y el anticuerpo Anti-IgG de conejo unido a HRP (1:10000, Jackson ImmunoResearch) se usaron como anticuerpos secundarios.

Para los experimentos de inmunocitoquímica los anticuerpos primarios usados fueron: anti-Nav1.5 de conejo (1:50, Alomone, Israel), anti- $\alpha$ 1-sintrofina de conejo (1:50, Sigma) y anti-Kir2.1 de ratón (1:100, Neuromab, USA) mientras que los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Alexa Fluor Anti-IgG de ratón generado en burro y Alexa Fluor Anti-IgG de conejo generado en burro (longitud de onda de excitación 488 o 594 nm) (1:500, Jackson ImmunoResearch).

### **9.2. Compuestos y otros plásmidos**

Para localizar donde se quedaban retenidos los distintos mutantes del canal Nav1.5, se utilizaron varias estrategias que rescatan a mutantes retenidos en el RE, tales como una disminución de la temperatura de incubación. Para ello, se mantuvieron las células (a las 24 horas de transfectarlas) a 25°C otras 24 horas antes de realizar los experimentos de electrofisiología. En otro grupo de experimentos se incubaron las células transfectadas con 4-fenilbutirato (Sigma), que actúa como chaperona química del canal Nav1.5, a una

concentración final en placa de 5 mM, durante 24 horas antes de realizar los experimentos de electrofisiología (Dolz-Gaitón y cols., 2013).

Además, se utilizó un plásmido que codificaba para MOG-1. El vector de expresión pCMV6-AC-GFP con el ADNc de MOG-1 unido a GFP fue suministrado por Origene (Origene, USA).

## **10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

En cada serie homogénea de experimentos se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el error estándar de la media (EEM). Los datos que aparecen en las distintas tablas y representaciones gráficas de esta Tesis Doctoral se expresan como la media $\pm$ EEM para un determinado número (n) de experimentos. Para las comparaciones entre diferentes grupos, la prueba *t* de Student no pareada o el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Newman-Keuls. En muestras de pequeño tamaño ( $n < 15$ ), la significancia estadística fue confirmada utilizando tests no paramétricos. Las comparaciones entre variables categóricas fueron hechas usando la prueba Z. Para tener en cuenta la evaluación de muestras repetidas, los datos fueron analizados con modelos multinivel de efectos mixtos. Se consideraron como significativas aquellas diferencias para las que el valor de *P* resultó ser menor de 0.05.

Para la realización del análisis estadístico y la composición de las figuras que ilustran esta Tesis Doctoral se emplearon la aplicación CLAMPFIT del paquete informático PCLAMP (v9.0) (Molecular Devices), las aplicaciones Excel y PowerPoint del paquete informático Microsoft Office 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) y el programa Prism (v3.0 y v4.0) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU).



## **IV. RESULTADOS**





Los resultados de la presente Tesis Doctoral se han dividido en tres apartados. En el primero de ellos se demuestra que la modulación recíproca positiva entre  $I_{K1}$  e  $I_{Na}$  se asocia a una colocalización/interacción entre los canales cardiacos Kir2.1 y Nav1.5. En el segundo apartado, se describen y analizan los efectos de mutantes del canal Nav1.5 con déficit de función, sobre la modulación recíproca positiva  $I_{K1}$ - $I_{Na}$  en varios modelos celulares. Por último, en el tercer apartado, se analiza el mecanismo responsable del diferente comportamiento de las distintas mutaciones del canal Nav1.5 estudiadas.

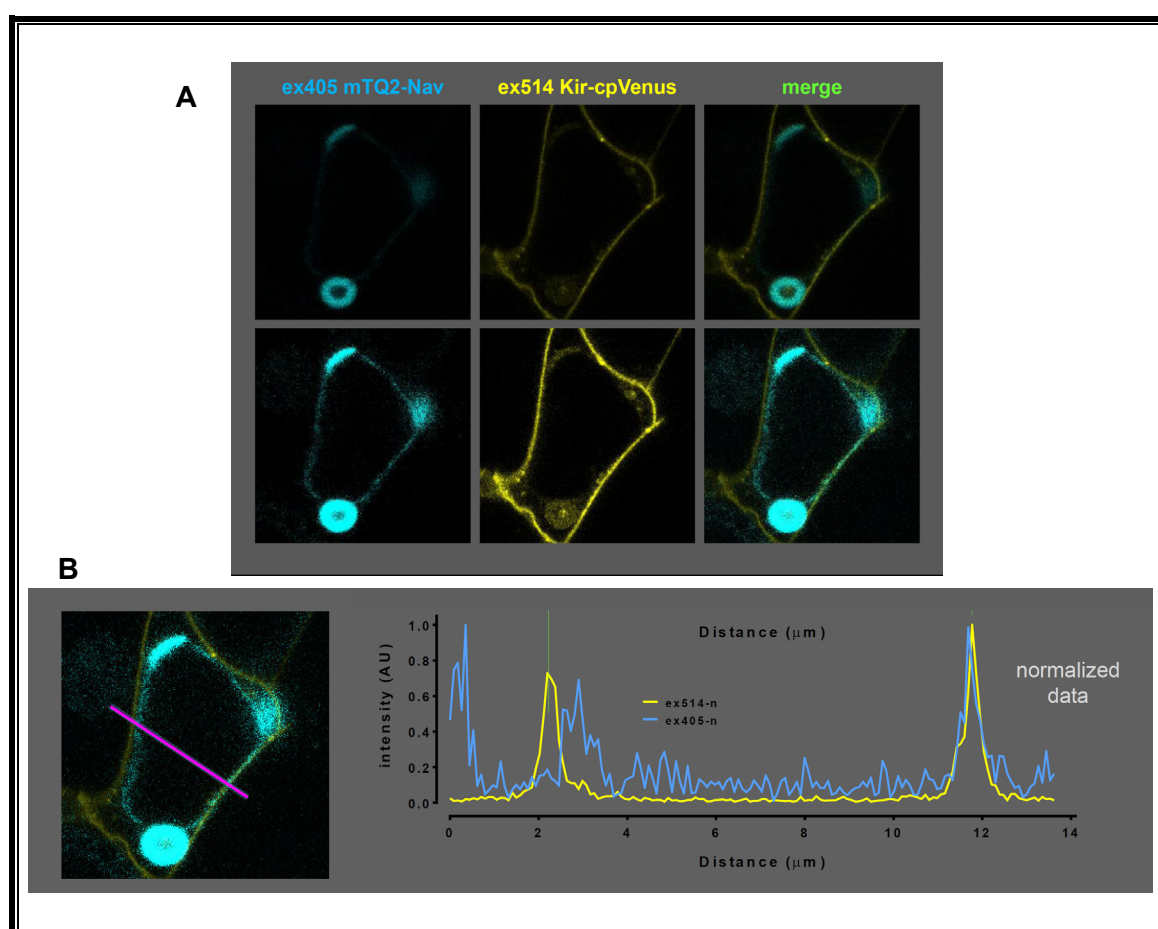
## **1. LA MODULACIÓN POSITIVA ENTRE CANALES Kir2.1 Y Nav1.5 CARDIACOS SE DEBE A UNA INTERACCIÓN ENTRE AMBOS**

### **1.1. Identificación mediante microscopía confocal de la colocalización de los canales Kir2.1 y Nav1.5**

Recientemente se ha demostrado que existe una modulación recíproca positiva del nivel de expresión de los canales Nav1.5 y Kir2.1/Kir2.2 (Milstein y cols., 2012; Matamoros y cols., 2016). De esta forma la presencia conjunta de canales Nav1.5 con canales Kir2.1/Kir2.2 produce un aumento de la corriente generada por los canales Nav1.5 ( $I_{Nav1.5}$ ) y *viceversa*. En la presente Tesis Doctoral analizamos si esta relación funcional entre ambos canales implica una relación más o menos estrecha de los mismos en la membrana celular. Para ello, en primer lugar, recurrimos a la microscopía confocal. Como se ha descrito detalladamente en el apartado de Métodos se obtuvieron mediante técnicas de subclonaje un constructo en el cual el canal Kir2.1 se unía a un fluoróforo amarillo denominado *venus*, y otro constructo en el que el canal Nav1.5 se unió a un fluoróforo que emite luz turquesa (*monomeric Turquoise 2, mTq2*). En ambos casos los fluoróforos fueron insertados antes del extremo N-terminal de los canales.

A continuación, se transfectaron células CHO, que carecen de canales en la membrana, con los plásmidos de ADNc que codificaban para cada uno de los constructos por separado y un tercer lote fue cotransfectado con ambos plásmidos simultáneamente. En la Figura IV.1A se observan imágenes de fluorescencia obtenidas en células con el canal Nav1.5-mTq2 (405 nm) y el canal Kir2.1-venus (514 nm). En los paneles intermedios de la Figura IV.1A se observa que en células CHO los canales Kir2.1 se expresan fundamentalmente en la membrana celular, apareciendo también algunas acumulaciones de

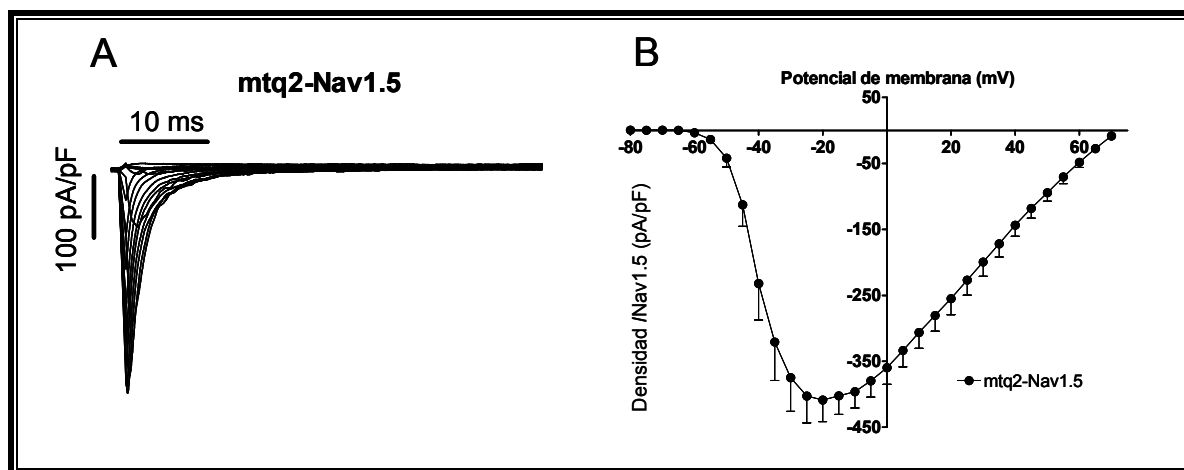
proteínas en vesículas citoplasmáticas. Sin embargo, el canal Nav1.5 debido a su gran tamaño y complejidad tendía a acumularse en estructuras vesiculares (Figura IV.1A panel izquierdo). Esta acumulación eclipsaba la emisión de los canales localizados en la membrana cuya identificación se dificultaba más si disminuíamos la cantidad de plásmido con la cual se transfectaban las células. A pesar de esta dificultad metodológica en la mayoría de células cotransfectadas se podían localizar zonas de la membrana plasmática en la que se identificaba la presencia de los canales Nav1.5-mTq2.



**Figura IV.1.** Microscopía de fluorescencia en células CHO cotransfectadas con los canales Nav1.5 -fusionados a mTq2 (*monomeric Turquoise 2*), una variante más brillante de la proteína fluorescente turquesa insertada antes del extremo N-terminal de Nav1.5- y los canales Kir2.1 –fusionados a cp173Venus, una proteína fluorescente amarilla (YFP) mejorada y modificada por permutación circular en el aminoácido 173 para obtener la quimera cp173Venus-Kir2.1 (también insertada antes del extremo N-terminal de Kir2.1). El fluoróforo mTq2 se observa a una longitud de onda de 405 nm y Venus a 514 nm. El panel izquierdo representa las dos imágenes fluorescentes superpuestas (*merge*). (**B**) Corte longitudinal de una célula donde se observan que los picos de intensidad de ambos coinciden en la región de la membrana celular.

Es importante destacar, que los canales Nav1.5-mTq2 eran perfectamente funcionales y que la dificultad para demostrar su presencia en la membrana no implicaba que no

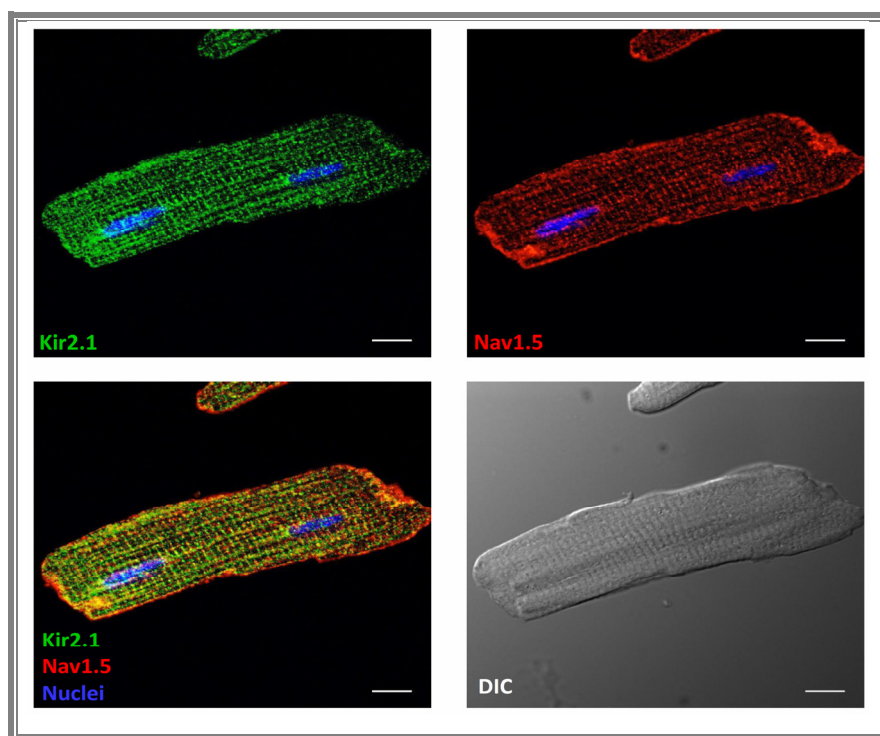
estuvieran presentes en la misma, puesto que generaban corrientes ( $I_{Nav1.5}$ ) idénticas, tanto en densidad como características electrofisiológicas, a las generadas por los canales no asociados al fluoróforo (Figura IV.2). En la Figura IV.1B se observa un perfil de un corte transversal de la célula mostrada en el Panel A donde se aprecia que la fluorescencia emitida por ambos canales es máxima en la región de la membrana celular.



**Figura IV.2.** Los canales mtq2-Nav1.5 transfectados en células CHO trafican a membrana y son funcionales. (A) Familia de trazos de  $I_{Nav1.5}$  en células CHO transfectadas con el canal Nav1.5 fusionado al fluoróforo mtq2 (1.6  $\mu$ g). (B) Relaciones I-V para  $I_{Nav1.5}$  registrado en células CHO que expresaban el canal Nav1.5 fusionado al fluoróforo mtq2.

## 1.2. Colocalización de los canales Kir2.1 con Nav1.5 en miocitos ventriculares de rata

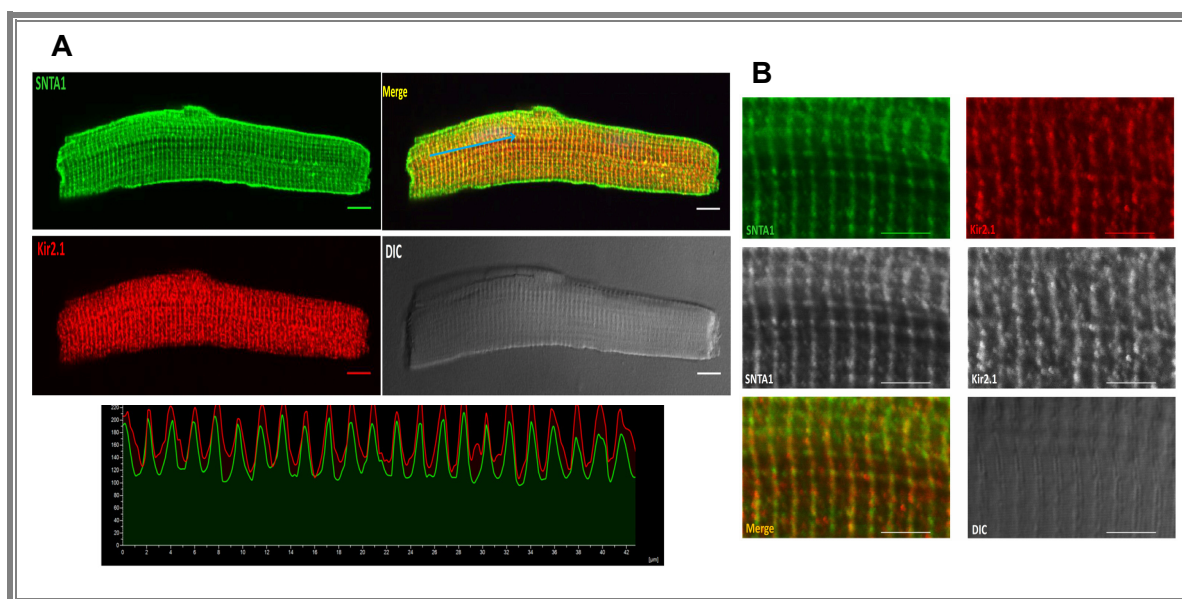
Dadas las limitaciones que presenta la identificación de los canales Nav1.5 en sistemas de transfección heterólogos, recurrimos a la localización de los canales Nav1.5 y Kir2.1 por técnicas inmunocitoquímicas en células cardíacas. En los experimentos se utilizaron miocitos de rata disociados enzimáticamente, identificándose mediante los anticuerpos específicos los canales Nav1.5 y Kir2.1. Tras la tinción de ambos canales para inmunofluorescencia, los miocitos se observaron en cortes Z con un microscopio confocal (ver apartado 7.1. de Métodos). Los núcleos se tiñeron con DAPI.



**Figura IV.3. Análisis inmunocitoquímico y colocalización de los canales Kir2.1 (verde) y Nav1.5 (rojo) en miocitos ventriculares disociados de ratas adultas.** Se observa un patrón de tinción indicativo de distribución t-tubular. Los núcleos se tiñeron con DAPI. La imagen en blanco y negro (DIC) en contraste de fases muestra la morfología fusiforme de un miocito fijado donde se aprecian las estriaciones. Escala 10  $\mu\text{m}$ .

Como se observa en la Figura IV.3, los canales Kir2.1 (señal verde, panel superior izquierdo) se localizan en las estriaciones de la membrana, así como en las membranas laterales del miocito. Sin embargo, no parecen concentrarse en los extremos del mismo donde se encuentran los discos intercalares. Los discos intercalares forman parte de las uniones estrechas (*gap junctions*) que comunican eléctricamente unos miocitos con otros longitudinalmente. Por su parte, los canales Nav1.5 (señal roja panel superior derecho) se localizan además de en las membranas laterales y en las estriaciones celulares, en los discos intercalares. Estos resultados concuerdan con los descritos previamente por otros autores (Petitprez y cols., 2011; Sato y cols., 2011; Shy y cols., 2013). Como se puede observar en el panel inferior izquierdo, los canales Kir2.1 y Nav1.5 se colocalizan fundamentalmente en las estriaciones de los miocitos y en las membranas laterales. El panel inferior derecho de la Figura IV.3 se muestra una fotografía tomada mediante microscopía de contraste diferencial de interferencia que demuestra que la morfología de los miocitos no se veía afectada con su cultivo y tinción. Se puede apreciar su forma rectangular y las estriaciones propias de los miocitos cardiacos.

Como se ha mencionado, nuestros resultados previos demostraron que para que se produjera la modulación recíproca positiva entre los canales Kir2.1/2.2 y Nav1.5 era necesaria la unión de dichos canales a la  $\alpha 1$ -sintrofina. De hecho, los canales Kir2.3 que no pueden unirse a  $\alpha 1$ -sintrofina no aumentan la  $I_{Nav1.5}$  cuando son cotransfectados con canales Nav1.5 (Matamoros y cols., 2016). Por tanto, decidimos analizar mediante inmunofluorescencia si la  $\alpha 1$ -sintrofina colocalizaba también con los canales Kir2.1. Para ello, en primer lugar se identificó la presencia de  $\alpha 1$ -sintrofina, de nuevo en miocitos ventriculares de rata, utilizando anticuerpos específicos frente a  $\alpha 1$ -sintrofina. Como puede verse en la Figura IV.4A (panel superior izquierdo) la  $\alpha 1$ -sintrofina se localiza preferentemente en membrana lateral mientras que apenas está presente en los discos intercalares (Matamoros y cols., 2016). Estos resultados concuerdan con los descritos previamente por Petitprez y cols. en miocitos ventriculares de rata (Petitprez y cols., 2011). Cabe destacar que nuestros resultados demostraban que la  $\alpha 1$ -sintrofina, al igual que los canales Kir2.1 y Nav1.5, está presente también en las estriaciones del miocito, patrón que no se había observado previamente cuando la inmunolocalización se había realizado utilizando anticuerpos anti pan-sintrofina, es decir, aquellos que reconocen todos los tipos de sintrofina (Figura IV.4A, panel superior izquierdo). La superposición de las inmunolocalizaciones de los canales Kir2.1 y la  $\alpha 1$ -sintrofina (*merge* en la Figura IV.4A) demuestra la colocalización de canales Kir2.1 (rojo) y de la  $\alpha 1$ -sintrofina (SNTA1, en verde). En la Figura IV.4B se muestran ampliadas las fotografías de una región de los miocitos representados en el panel A. En el panel inferior de la Figura IV.4A se muestra un perfil representativo de la intensidad de la fluorescencia a lo largo del eje longitudinal de los cardiomiocitos. Como puede observarse los picos de señal fluorescente de la  $\alpha 1$ -sintrofina y los canales Kir2.1 coinciden perfectamente y aparecen cada 2  $\mu m$  aproximadamente. Este patrón estriado puede coincidir bien con la distribución de los túbulos T o bien con las crestas de la membrana.



**Figura IV.4.** (A) Análisis inmunocitoquímico y colocalización de la  $\alpha$ -1-sintrofina (SNTA1 en verde) y Kir2.1 (rojo) en miocitos ventriculares disociados de ratas adultas. En el panel inferior se observa el perfil de intensidad de inmunofluorescencia a lo largo del eje longitudinal del miocito (indicado con la flecha azul en el *merge*). El pico de intensidad (señal) de Kir2.1 y SNTA1 aparece cada 2  $\mu$ m. Escala 10  $\mu$ m. (B) Imagen confocal ampliada (100x) de las estriaciones de los miocitos donde se observa la colocalización de Kir2.1 y SNTA1 coinciden. Escala 5  $\mu$ m.

## 2. EFECTO DE MUTACIONES EN EL CANAL Nav1.5 SOBRE LA MODULACIÓN POSITIVA

### 2.1. Características de los mutantes del canal Nav1.5 estudiados

Demostrada la interacción funcional y la colocalización de los canales Nav1.5 y Kir2.1 en las membranas de los miocitos cardiacos la pregunta que se suscitaba es: ¿qué ocurre cuando uno de los canales presenta una mutación que produce su déficit de función?

Las mutaciones en el gen *SCN5A* que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5 son más frecuentes que las mutaciones en el gen *KCNJ2* que codifica los canales Kir2.1. Las segundas son responsables de la aparición del Síndrome de Andersen-Tawil que, además de con arritmias cardiacas, se acompaña de alteraciones musculares, estructurales en manos y pies y dismorfia característica. Las mutaciones que producen déficit de función de los canales Nav1.5 son responsables de la aparición del SBr, que es el más frecuente de los síndromes arritmogénicos hereditarios, además de otras formas de arritmias genéticamente determinadas (ver apartado I.4.5). Por tanto dada la mayor prevalencia y relevancia clínica decidimos estudiar las consecuencias funcionales que tenía para la modulación recíproca entre

canales Nav1.5 y Kir2.1 la presencia de canales Nav1.5 con mutaciones que producen su déficit de función.

### 2.1.1. Mutantes de Nav1.5 seleccionados

De entre los mutantes del canal Nav1.5 que producen déficit de función elegimos tres (p.D1690N, p.G1748D, y p.D1816VfsX7) para realizar este estudio. Las características de estas mutaciones y su localización se describen en la Tabla IV.1 y la Figura IV.5A, respectivamente (Núñez y cols., 2013; Dolz-Gaitón y cols., 2013).

<b>Mutación</b>	<b>Localización</b>	<b>EDN sobre Nav1.5 WT</b>	<b>Alteración del <i>gating</i></b>	<b>Patología</b>	<b>Ref.</b>
<b>p.D1816VfsX7</b>	C-terminal truncado	No	No	síndrome solapado	Dolz-Gaitón y cols., 2013
<b>p.G1748D</b>	S6 del DIV	Sí	Intensa	SBr 1	Núñez y cols., 2013
<b>p.D1690N</b>	Poro del DIV	Sí	Moderada	SBr 1	Núñez y cols., 2013

**Tabla IV.1. Características de las mutaciones del canal Nav1.5 estudiadas.** EDN: Efecto dominante negativo. SBr 1: Síndrome de Brugada tipo 1. Ref.: Referencia.

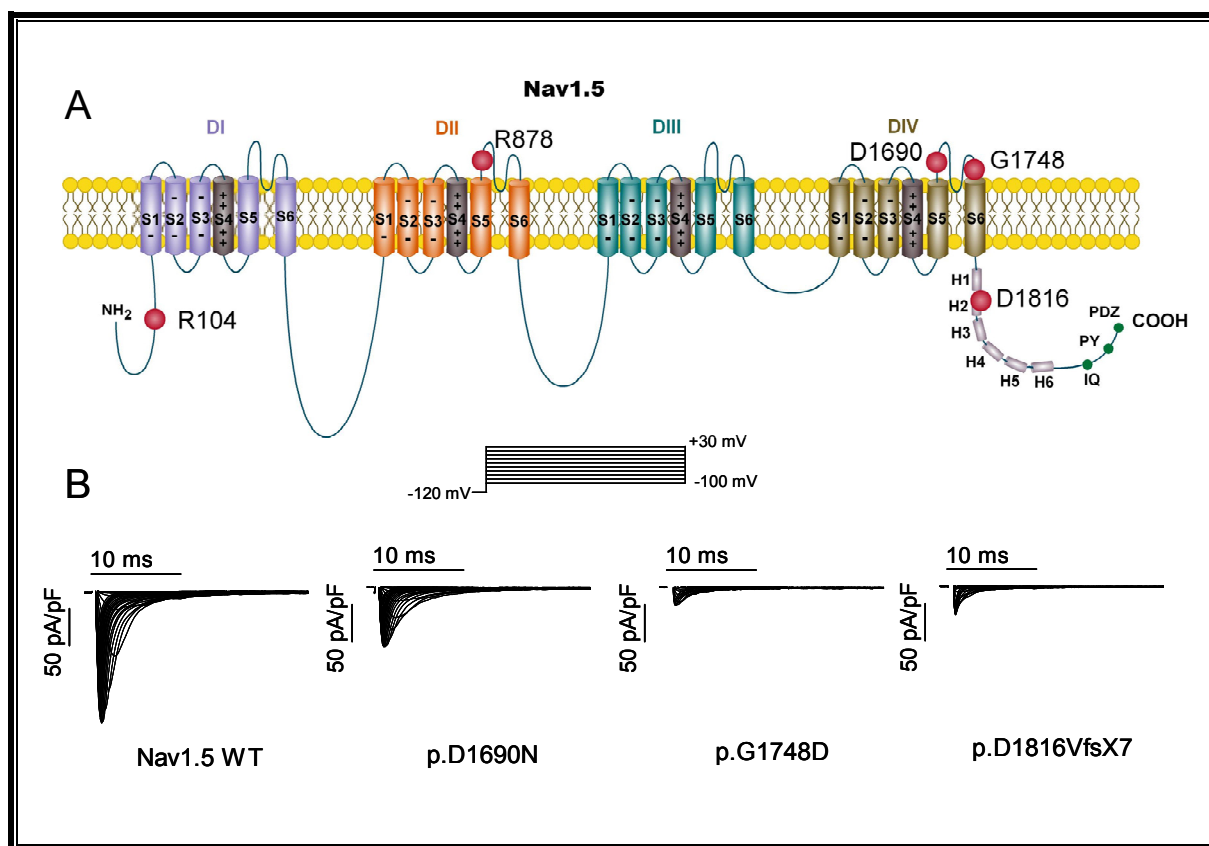
La mutación p.D1690N produce la sustitución de un residuo aspártico por una asparagina en la posición 1690, situado en el inicio del bucle extracelular de aminoácidos (poro) que conecta el S5 con el S6 del dominio IV del canal. Por su parte, la mutación p.G1748D implica la sustitución de un residuo glicina por un aspártico en la posición 1748 también localizado en el poro del dominio IV pero en este caso prácticamente en el inicio del S6 (Figura IV.5A). Ambas mutaciones se describieron en heterozigosis compuesta en un probando español de 61 años (Núñez y cols., 2013). Curiosamente el sujeto nunca había padecido un evento arrítmico aunque tenía una mutación en los dos alelos del gen SCN5A. Un electrocardiograma rutinario realizado por el servicio médico de la empresa le diagnosticó un SBr tipo 1 y pocas semanas después el paciente debutó con un síncope. En el alelo portador de la mutación p.D1690N también estaba presente la variedad polimórfica que codifica la sustitución p.H558R. La variante p.H558R es un modulador genético que alivia la pérdida de función producida por algunas mutaciones, en algunos casos cuando está en *cis* (en



el mismo alelo en el cual está la mutación, como era el caso del probando) y en otros cuando está en *trans* (en el alelo no mutado) (Wilde y Brugada, 2011). La única hija del probando, madre a su vez de un niño que no fue estudiado genéticamente, era portadora de la mutación p.G1748D y tampoco había tenido ningún evento arrítmico hasta aquel momento. La mutación Nav1.5 p.D1816VfsX7 es fruto de un desplazamiento del marco de lectura que suprime 201 aminoácidos del dominio C-terminal de Nav1.5 y que fue identificada en 8 de los 15 miembros de una familia española repartidos en dos generaciones (Dolz-Gaitón y cols., 2013). Curiosamente, el fenotipo arrítmico de los portadores era variado, la probando y algunos familiares habían sufrido fibrilación ventricular idiopática, en otros, se manifestaba como bradicardia, DCCP, FA o SBr (Dolz-Gaitón y cols., 2013). Este tipo de síndromes en los que una única mutación da lugar a diversos fenotipos en los diversos familiares se denominan “síndromes solapados”.

#### 2.1.2. Características de las corrientes generadas por las mutaciones p.D1690N, p.G1748D, y p.D1816VfsX7

La Figura IV.5 muestra familias de trazos de corriente generadas por canales Nav1.5 nativos (WT), p.D1690N, p.G1748D, o p.D1816VfsX7 registradas en células CHO. Como se describe en Métodos, las células se transfectaban transitoriamente con el ADNc que codifica el canal Nav1.5 WT o sus versiones mutantes (1.6  $\mu$ g) junto con la subunidad Nav $\beta$ 1 (1.6  $\mu$ g). Como se puede observar los canales p.D1690N generan una  $I_{Nav1.5}$  cuya densidad es aproximadamente el 50% de la densidad de la corriente generada por los canales WT. Por el contrario, la densidad de la  $I_{Nav1.5}$  generada por los canales p.G1748D y p.D1816VfsX7 estaban disminuidas en prácticamente un 80% respecto a la de la generada por canales WT. Los tres canales traficaban de forma deficiente a la membrana y, además, presentaban alteraciones de *gating* que eran muy marcadas en el caso de los canales p.G1748D. Los resultados confirman datos previamente analizados en nuestro laboratorio, demostrando la disfuncionalidad y el carácter patológico de los mutantes (Núñez y cols., 2013; Dolz y cols., 2013). Curiosamente, el único mutante que no producía EDN es el p.D1816VfsX7 ya que cuando se contranfectaban con los canales WT (en proporción 0.5:0.5), la densidad de la  $I_{Nav1.5}$  disminuía un 50% aproximadamente con respecto a la generada por la transfección con canales WT exclusivamente. Es decir que simulando lo que ocurre en un paciente que tuviese la mutación en heterocigosis se produciría “haploinsuficiencia” (Dolz-Gaitón y cols., 2013).

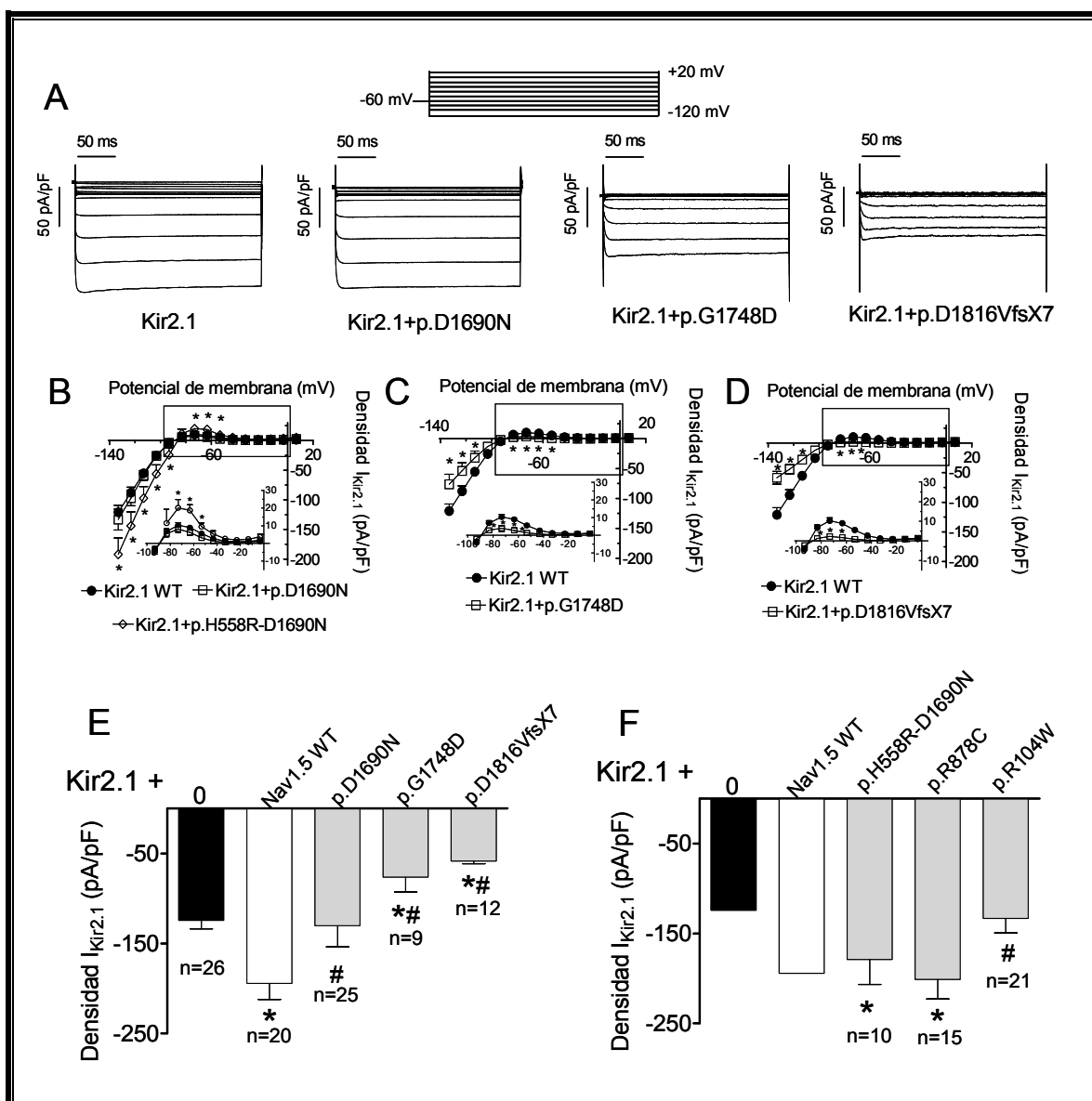


**Figura IV. 5. Localización de las mutaciones del canal Nav1.5 y sus respectivos trazos.** (A) Diagrama topológico del canal Nav1.5 que muestra la localización de las mutaciones estudiadas. (B) Familia de trazos representativa de  $I_{Nav1.5}$  obtenidos con el protocolo de pulsos mostrado en la parte superior del panel en células CHO transfectadas con el canal Nav1.5 WT, p.D1690N, p.G1748D o p.D1816VfsX7.

Por el contrario la cotransfección de canales p.G1748D o p.D1690N con canales WT genera una corriente cuya densidad es significativamente inferior a la generada por los canales WT, es decir, que ambos mutantes producen EDN (Núñez y cols., 2013). En el caso de los canales Nav1.5, en el que una única proteína es capaz de generar canales funcionales, el EDN implica que la proteína mutada está produciendo un efecto “tóxico” bien impidiendo que los canales Nav1.5 WT alcancen la membrana o bien alterando su función una vez la han alcanzado.

## 2.2. Efecto de los mutantes p.G1748D, p.D1690N y p.D1816VfsX7 sobre la $I_{Nav1.5}$ e $I_{Kir2.x}$ en células CHO

A continuación analizamos el efecto de los mutantes del canal Nav1.5 anteriormente descritos sobre la modulación recíproca entre canales Nav1.5 y Kir2.1.

2.2.1. Efecto de los mutantes del canal Nav1.5 sobre la  $I_{Kir2.1}$ 

**Figura IV.6. Efecto de la expresión de los mutantes de Nav1.5 en células CHO sobre la corriente  $I_{Kir2.1}$ .** (A) Familia de trazos representativa de  $I_{Kir2.1}$  registrados tras aplicar el pulso mostrado en la parte superior. (B-D) Relaciones I-V para  $I_{Kir2.1}$  registrado en células CHO que expresaban Kir2.1 solo o junto con los mutantes del canal de Nav1.5 p.D1690N (B), p.D1690N-H558R (B), p.G1748D (C) y p.D1816VfsX7 (D). Los recuadros inferiores muestran ampliado el rango de potenciales en el que se produce la salida de  $K^+$  y la rectificación. (E) Densidad máxima de  $I_{Kir2.1}$  registrada en células CHO transfectadas solo con Kir2.1 (1.6  $\mu$ g) (barra negra) o con el Nav1.5 WT (barra blanca) o los distintos mutantes de Nav1.5 estudiados (barras grises) (1.6  $\mu$ g) junto con la subunidad  $\beta$  (1.6  $\mu$ g). (F) Densidad máxima de  $I_{Kir2.1}$  registrada en células CHO transfectadas solo con Kir2.1 (1.6  $\mu$ g) (barra negra) o con el Nav1.5 WT (barra blanca) o los mutantes de Nav1.5 adicionales –el polimorfismo p.H558R-D1690N, el mutante que sí trafica p.R878C y el mutante del N-terminal p.R104W– (barras grises) (1.6  $\mu$ g) junto con la subunidad  $\beta$  (1.6  $\mu$ g). Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de “n” células. \*P<0.05 frente a Kir2.1 y # P<0.05 frente a Kir2.1+Nav1.5. Las “n” representan el número de células analizadas.

La Figura IV.6A muestra familias de trazos de  $I_{Kir2.1}$  registrados en células CHO transfectadas transitoriamente con el ADNc de Kir2.1 (1.6  $\mu$ g) solo o con el ADNc que

codifica para los distintos mutantes de Nav1.5 (1.6  $\mu$ g) más la subunidad Nav1.5- $\beta$  (1.6  $\mu$ g) tras aplicar el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior de la figura. Como ya se ha descrito (Milstein y cols., 2012, Matamoros y cols., 2016), la cotransfección de canales Kir2.1 con canales Nav1.5 WT produce un aumento significativo de la corriente  $I_{Kir2.1}$  medida a -120 mV ( $n \geq 20$ ,  $P < 0.05$ ), dando lugar a la modulación positiva (Figura IV.6E). La cotransfección de Kir2.1 con canales p.D1690N generaba una densidad de corriente  $I_{Kir2.1}$  similar a la generada por canales Kir2.1, a todos los voltajes estudiados (Figuras IV.6B y E). Por tanto, p.D1690N no es capaz de modular positivamente a los canales Kir2.1. Como ya hemos mencionado, el paciente al que se detectó esta mutación presentaba también el polimorfismo p.H558R en *cis* (p.H558R-D1690N). La  $I_{Nav1.5}$  generada por los canales p.H558R-D1690N era idéntica a la generada por los canales WT ya que el polimorfismo ejerce de chaperón sobre los canales p.D1690N (Núñez y cols., 2013). Como se puede observar en las Figuras IV.6B y F los canales p.H558R-D1690N sí modulaban positivamente la  $I_{Kir2.1}$  de forma que ésta no era diferente a la generada por los canales Kir2.1 en presencia de Nav1.5 WT. Sin embargo, los mutantes p.G1748D y p.D1816VfsX7 no solo abolen la modulación positiva que producen los canales Nav1.5 WT, si no que disminuyen la  $I_{Kir2.1}$  de forma significativa ( $n \geq 9$ ,  $P < 0.05$ ) (Figuras IV.6C, D y E). Se puede decir, por tanto, que la presencia de canales p.G1748D y p.D1816VfsX7 produce un EDN sobre los canales Kir2.1 (panel C, D y E). Este resultado sugiere que los mutantes p.G1748D y p.D1816VfsX7 del canal de sodio o bien impiden que los canales Kir2.1 alcancen la membrana, “atrapándolos” en algún compartimento intracelular, o bien limitan su función una vez éstos se encuentran en la membrana.

Los tres canales mutados analizados (p.D1690N, p.G1748D, y p.D1816VfsX7) no trafican adecuadamente hasta la membrana celular y tienen en común que la mutación se encuentra en el dominio IV o C-terminal del canal. Para descartar que el efecto observado pudiera ser “dominio” específico estudiamos también el mutante p.R104W. Clatot y cols. (2012) demostraron que los canales con la mutación en el residuo R104, que se encuentra en el dominio N-terminal, apenas trafican a la membrana. Como se puede observar en la Figura IV.6F, la cotransfección de canales p.R104W con Kir2.1 no moduló positivamente la  $I_{Kir2.1}$ .

Dado que los cuatro mutantes estudiados no trafican adecuadamente a la membrana (Núñez y cols., 2013; Dolz y cols., 2013) quisimos analizar los efectos producidos por otros mutantes del canal Nav1.5 con déficit de la función que sí traficaban bien hasta la misma. Es el caso del mutante p.R878C que a pesar de estar presente en la membrana, no genera

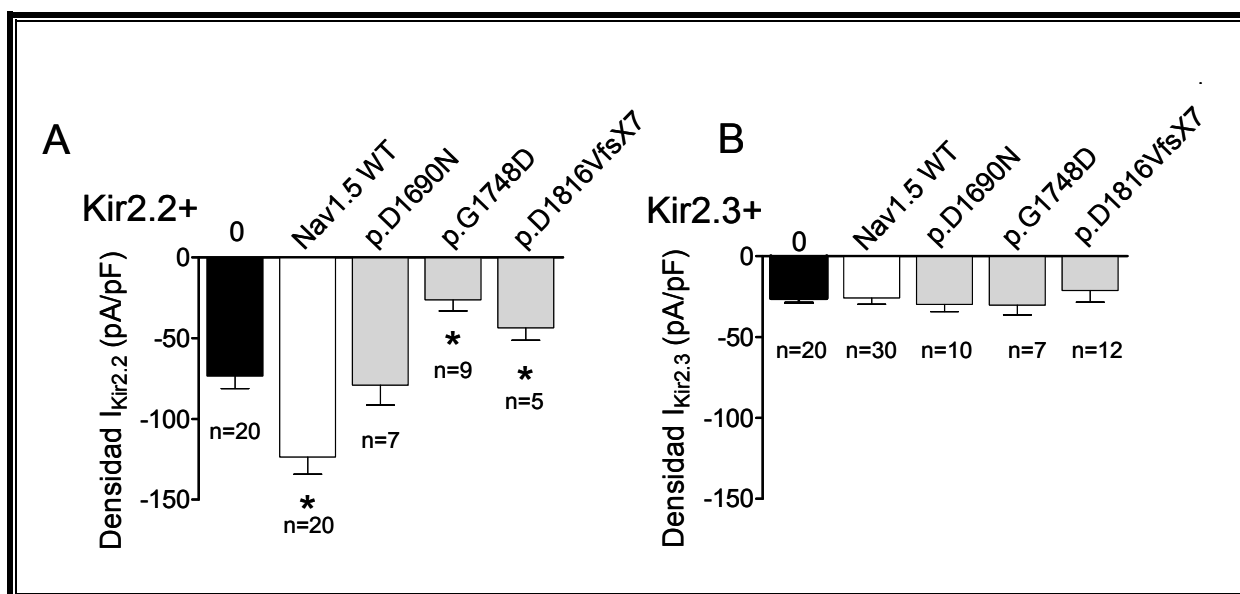
corriente por alteraciones en su *gating* (Zhang y cols., 2008). La Figura IV.6E muestra que la cotransfección p.R878C con canales Kir2.1 sí aumenta significativamente la densidad de  $I_{Kir2.1}$  produciendo una modulación positiva de intensidad similar a la producida por canales Nav1.5 WT (a -120 mV,  $P < 0.05$ ).

Podemos concluir que los mutantes del canal Nav1.5 que presentan déficit de su función pero que sí trafican a membrana modulan positivamente la  $I_{Kir2.1}$  pero que aquellos mutantes con defecto de tráfico o bien suprimen la modulación positiva (p.D1690N y p.R104W) o bien producen una disminución adicional de la  $I_{Kir2.1}$  (EDN; p.G1748D y p.D1816VfsX7).

### 2.2.2. Efecto de los mutantes del canal Nav1.5 sobre la $I_{Kir2.2}$ e $I_{Kir2.3}$

Como ya se ha mencionado, los canales Nav1.5 también modulan positivamente la corriente generada por homotetrámeros de canales Kir2.2 ( $I_{Kir2.2}$ ) pero no la generada por homotetrámeros ( $I_{Kir2.3}$ ) o heterotetrámeros en los que participen los canales Kir2.3 (Matamoros y cols., 2016). Estos datos, que sugieren que los canales Nav1.5 interactúan con los canales Kir2.1/2.2 pero no con los Kir2.3, fueron confirmados de nuevo en la presente Tesis Doctoral (Figura IV.7).

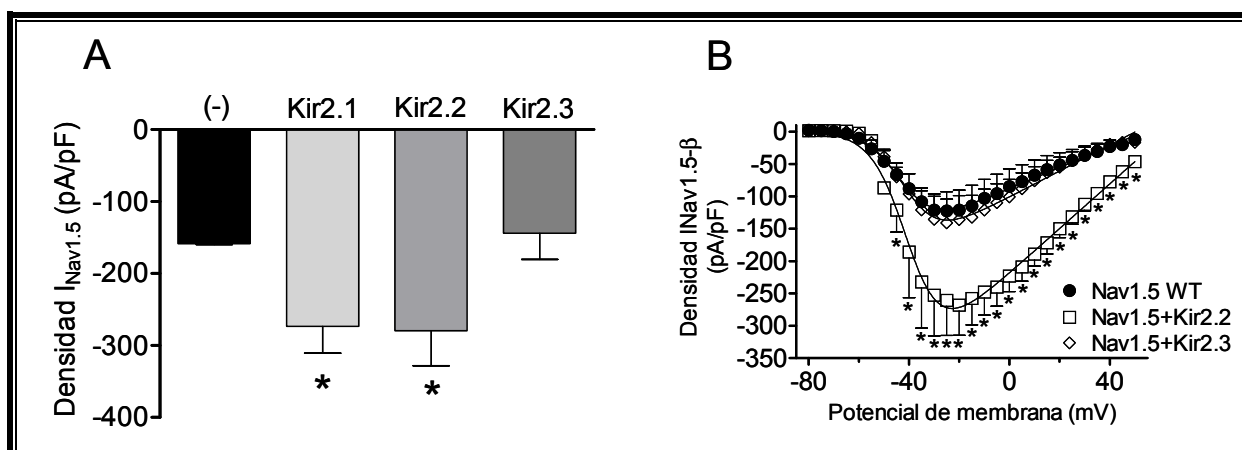
En la Figura IV.7A se puede observar que la cotransfección con canales p.D1690N no modula de forma positiva la  $I_{Kir2.2}$ , y que la cotransfección con canales p.G1748D o p.D1816VfsX7 disminuye significativamente la  $I_{Kir2.2}$ , produciendo EDN. Es decir, los mutantes de Nav1.5 estudiados ejercen idénticos efectos sobre la  $I_{Kir2.2}$  y la  $I_{Kir2.1}$ . Por el contrario, los canales Kir2.3 ni interaccionan ni son modulados por los canales Nav1.5: la  $I_{Kir2.3}$  generada por canales Kir2.3 no se modifica por la cotransfección de dichos canales con ninguno de los mutantes de los canales Nav1.5 analizados (Figura IV.7B).



**Figura IV.7. Efecto de los mutantes de Nav1.5 en  $I_{Kir2.2}$  e  $I_{Kir2.3}$  en células CHO.** Densidad de  $I_{Kir2.2}$  e  $I_{Kir2.3}$  a -120 mV registrada en células CHO transfectadas con Kir2.2 o Kir2.3 solo o junto al WT o los mutantes de Nav1.5. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de “n” células. \* $P < 0.05$  frente a Kir2.2.

### 2.2.3. Efectos de la cotransfección de canales Kir2.2 o Kir2.3 y Nav1.5 WT sobre la $I_{Nav1.5}$

Los canales Kir2.1 modulan positivamente la expresión de canales Nav1.5, incrementando la  $I_{Nav1.5}$  (Milstein y cols., 2012, Matamoros y cols., 2016). Sin embargo se desconoce el efecto de los canales Kir2.2 y Kir2.3 sobre la corriente  $I_{Nav1.5}$ . Por ello decidimos registrar dicha corriente en células CHO cotransfectadas o no con canales Kir2.2 o Kir2.3 (Figura IV.8). La Figura IV.8A muestra la densidad máxima de la  $I_{Nav1.5}$  registrada en células CHO que solo expresan canales Nav1.5- $\beta$  (1.6+1.6  $\mu$ g) o junto a canales Kir2.1, Kir2.2 o Kir2.3 (1.6  $\mu$ g) y la Figura IV.8B las relaciones densidad de la  $I_{Nav1.5}$ -voltaje obtenidas al representar la densidad de la corriente a cada uno de los potenciales de membrana ensayados. Como se puede observar, la cotransfección con canales Kir2.2 aumenta significativamente la densidad de  $I_{Nav1.5}$  a todos los potenciales de membrana (Figuras IV.8A y B). Más aún, el aumento en la densidad máxima de la  $I_{Nav1.5}$  producido por los canales Kir2.2 es idéntico al producido por los canales Kir2.1 (Figura IV.8A). Sin embargo, la cotransfección con canales Kir2.3 no aumenta la densidad de la  $I_{Nav1.5}$  a ninguno de los potenciales de membrana, siendo la densidad de la  $I_{Nav1.5}$  idéntica a la generada en ausencia de dichos canales (Figura IV.8B). Por tanto, los canales Kir2.3 ni interaccionan ni modulan a los canales la  $I_{Nav1.5}$ .

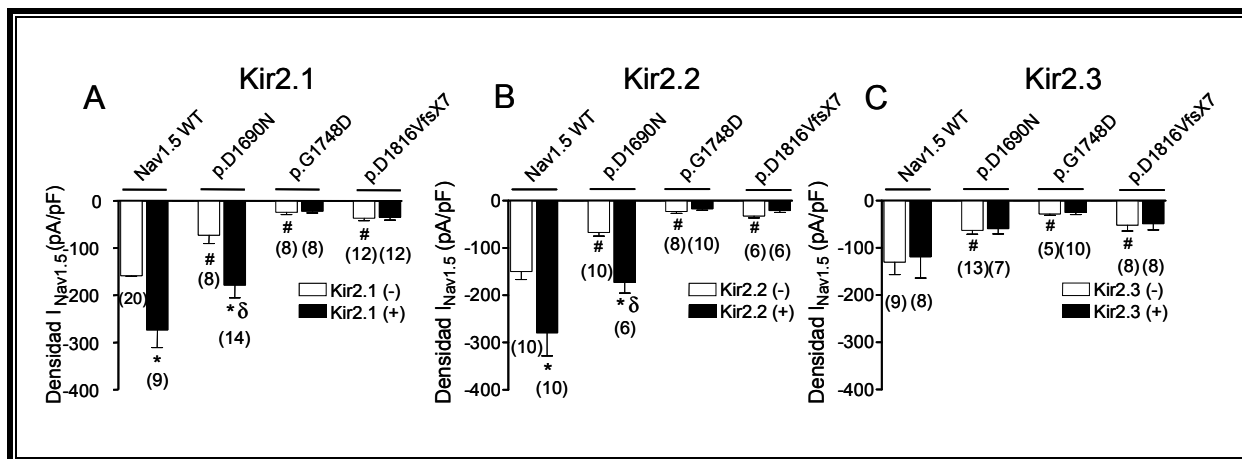


**Figura IV.8. Efectos de la coexpresión de canales Nav1.5 WT con canales Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 en células CHO sobre la corriente  $I_{Nav1.5}$ .** (A) Densidades máximas de  $I_{Nav1.5}$  registradas en células CHO expresando el canal Nav1.5 WT solo (barra negra) o junto con canales Kir2.1, Kir2.2 o Kir2.3 (barras grises). (B) Relaciones I-V para  $I_{Nav1.5}$  en células CHO expresando el canal Nav1.5 WT solo o junto con canales Kir2.2 o Kir2.3. Cada barra/punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 5$  experimentos. \* $P < 0.05$  frente a Nav1.5 solo.

#### 2.2.4. Efectos de la cotransfección de canales Kir2.x sobre la $I_{Nav1.5}$ generada por mutantes Nav1.5 con déficit de función

En la Figura IV.9 se representan las densidades máximas de la  $I_{Nav1.5}$  generadas por canales Nav1.5 WT, p.D1690N, p.G1748D, o p.D1816VfsX7 en ausencia o presencia de canales Kir2.1 (Figura IV.9A), Kir2.2 (Figura IV.9B), y Kir2.3 (Figura IV.9C). Como hemos descrito en el apartado 2.1, los tres mutantes de Nav1.5 analizados acarrear un defecto de tráfico y reducen la corriente  $I_{Nav1.5}$  en más del 50% respecto a la generada por los canales WT. Cuando se expresaron en células CHO el mutante p.G1748D o el p.D1816VfsX7 solos, generaron un pico de densidad muy pequeño de  $24.3 \pm 4.4$  pA/pF ( $n=8$ ) y de  $37 \pm 5.2$  pA/pF ( $n=12$ ) respectivamente, correspondiente al 15% y al 23% de la corriente generada por el canal WT ( $n=20$ ,  $P < 0.05$ ). Como se puede observar en las figuras IV.9A y 9B los canales Kir2.1 y Kir2.2 no eran capaces de modular positivamente la densidad de  $I_{Nav1.5}$  generada por canales p.G1748D, y p.D1816VfsX7. Es decir, que la disminución de la  $I_{Na}$  en los portadores de estas mutaciones será muy intensa. La coexpresión con canales Kir2.1 y Kir2.2 aumentó significativamente la densidad máxima de  $I_{Nav1.5}$  generada por canales Nav1.5 WT y p.D1690N. Por tanto, los canales Kir2.1 y Kir2.2 son capaces de modular positivamente la expresión de algunos canales mutantes de sodio con déficit de función como el p.D1690N. Sin embargo, hay que destacar que la corriente generada por la coexpresión de canales

p.D1690N con Kir2.1 o Kir2.2 es menor que la generada por canales Nav1.5 WT con Kir2.1/2.2 ( $n \geq 6$ ,  $P < 0.05$ ).



**Figura IV.9.** Efectos de la coexpresión de los mutantes de Nav1.5 con Kir2.1, Kir2.2 y Kir2.3 en células CHO sobre la corriente  $I_{Nav1.5}$ . Densidades máximas de  $I_{Nav1.5}$  registrados en células CHO expresando el canal Nav1.5 WT o los mutantes, sin (barras blancas) o en presencia (barras negras) de los canales Kir2.1 (A), Kir2.2 (B) o Kir2.3 (C). Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 5$  células. Los números en paréntesis representan el número de células analizadas. \* $P < 0.05$  frente a Nav1.5 WT solo; # $P < 0.05$  frente a Nav1.5 WT+Kir2.1 WT; □ $P < 0.05$  frente a p.D1690N solo.

Es importante recordar que en situación fisiológica en los miocitos cardiacos estarán presentes tanto los canales Nav1.5 como los Kir2.1, en otras palabras, que siempre habrá modulación recíproca positiva entre ambos. Por tanto, los datos sugieren que la  $I_{Na}$  generada en los miocitos de los portadores de la mutación p.D1690N será significativamente menor que la generada en ausencia de la mutación.

Por último, la Figura IV.9C demuestra que la coexpresión con canales Kir2.3 no modificaba la densidad  $I_{Nav1.5}$  generada por canales p.D1690N, p.G1748D, y p.D1816VfsX7 (Figura IV.9C), resultado que concuerda con la demostrada ausencia de interacción entre canales Kir2.3.

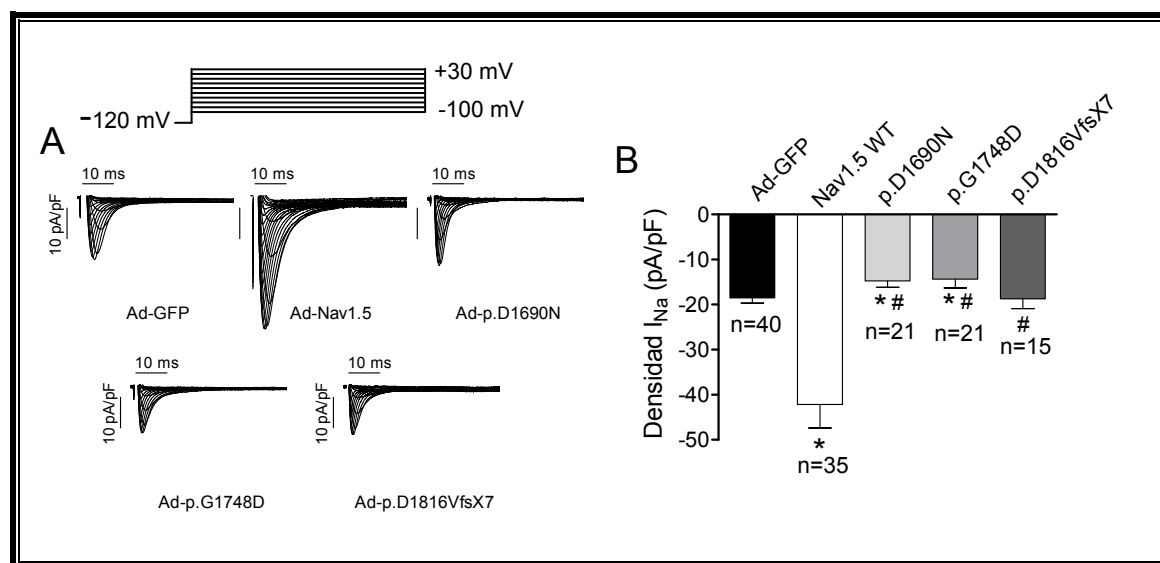
### 2.3. Efecto de las mutaciones p.D1690N, p.G1748D y p.D1816VfsX7 sobre la $I_{Na}$ e $I_{K1}$ en miocitos ventriculares de rata

Dado que el procesamiento de las proteínas que forman los canales puede presentar algunas diferencias en los sistemas de expresión heterólogos y en los miocitos cardiacos, quisimos corroborar los resultados previos en miocitos de rata. Para ello se disociaron



enzimáticamente miocitos cardiacos procedentes de ratas Sprague–Dawley mediante métodos descritos por nuestro laboratorio. Los miocitos se sembraron en placas Petri tal y como se describe en el apartado de Métodos (ver apartado 3.1.) y fueron transfectados con los plásmidos que codificaban Nav1.5 WT, p.D1690N, p.G1748D, o p.D1816VfsX7. Puesto que el rendimiento de la transfección mediante liposomas de células diferenciadas es bajo, encapsulamos los plásmidos codificantes en partículas adenovirales con las que fueron infectados los miocitos durante un período de 12 horas aproximadamente. Como control se utilizaron miocitos que fueron infectados con partículas adenovirales que solo codificaban la proteína verde fluorescente (Ad-GFP) lo que permitía la identificación de los miocitos transfectados. Las ratas tienen canales Nav1.5 y Kir2.x nativos por lo que tienen una corriente de  $I_{Na}$  y de  $I_{K1}$  *per se*.

### 2.3.1. Efecto de las mutaciones p.D1690N, p.G1748D y p.D1816VfsX7 sobre la $I_{Na}$

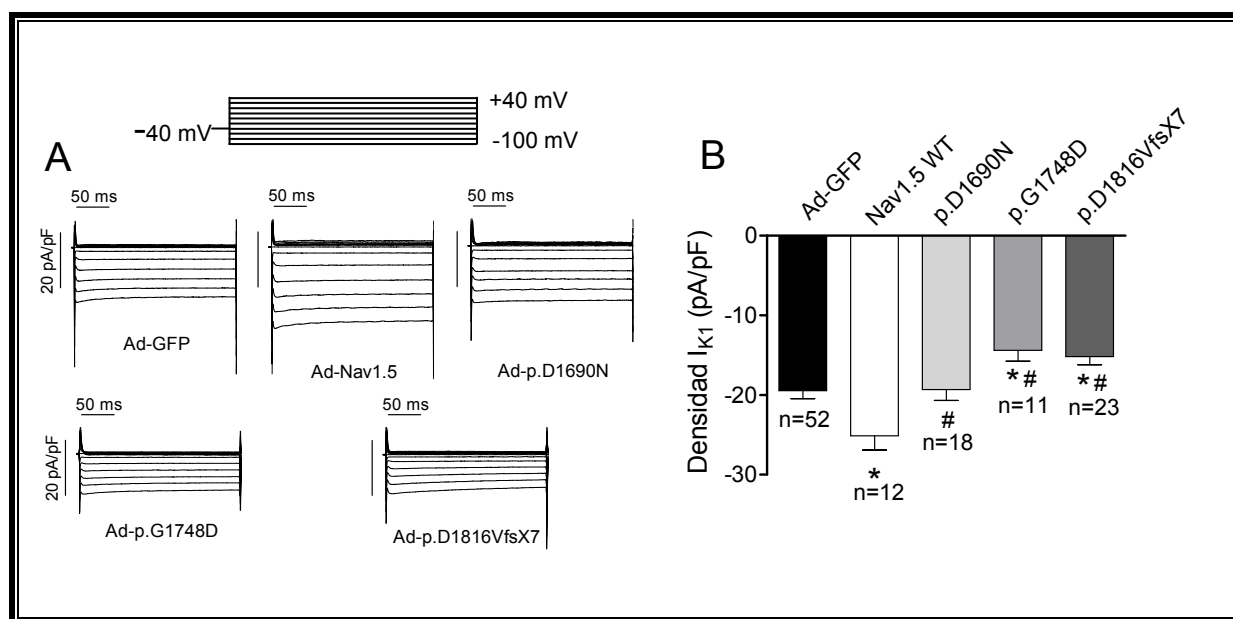


**Figura IV.10. Efecto de la expresión de los mutantes de Nav1.5 en miocitos ventriculares de rata sobre la corriente  $I_{Na}$ .** (A) Familia de trazos representativa de  $I_{Na}$  registrada tras aplicar el pulso mostrado en la parte superior. Ad-GFP representa la situación control (miocitos infectados con adenovirus que codifican para el GFP). (B) Densidad máxima de  $I_{Na}$  registrada en miocitos ventriculares de rata infectados con las construcciones adenovirales. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 15$  células. \* $P < 0.05$  frente a miocitos infectados con GFP y # $P < 0.05$  frente a miocitos infectados con Nav1.5 WT.

Como se puede observar en la Figura IV.10 la infección con el adenovirus que codifica los canales Nav1.5 WT (Ad-Nav1.5) duplica la densidad de la  $I_{Na}$  registrada ( $n \geq 35$ ,  $P < 0.05$ ). La densidad de la  $I_{Na}$  registrada en miocitos infectados con los mutantes Nav1.5 p.G1748D y p.D1690N resultó ser significativamente menor que la de los miocitos infectados

con el Ad-Nav1.5 WT ( $n \geq 21$ ,  $P < 0.05$ ) pero también frente a los miocitos control ( $n \geq 21$ ,  $P < 0.05$ ) (Figura IV.10). Este resultado indica que estos mutantes "atrapan" en algún compartimento intracelular a los canales Nav1.5 WT endógenos/nativos y ratifica los datos obtenidos previamente en células CHO demostrando que ambos mutantes producen EDN sobre los canales Nav1.5 WT (Núñez y cols., 2013). Por último la Figura IV.10 demuestra que los miocitos infectados con Ad-p.D1816VfsX7 generan una  $I_{Na}$  cuya densidad es significativamente menor a la generada por los miocitos infectados con Ad-Nav1.5 ( $n \geq 15$ ,  $P < 0.05$ ). Sin embargo, los resultados confirman que este mutante no produce EDN sobre los canales Nav1.5 endógenos, puesto que la densidad de la  $I_{Na}$  no es significativamente menor que la generada por los miocitos control.

### 2.3.2. Efecto de las mutaciones p.D1690N, p.G1748D y p.D1816VfsX7 sobre la $I_{K1}$



**Figura IV.11. Efecto de la expresión de los mutantes de Nav1.5 en miocitos ventriculares de rata sobre la corriente  $I_{K1}$ .** (A) Familia de trazos representativa de  $I_{K1}$  registrados tras aplicar el pulso mostrado en la parte superior. Ad-GFP representa la situación control (miocitos infectados con adenovirus que codifican para el GFP). (B) Densidad máxima de  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares de rata infectados con los constructos adenovirales. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 11$  células. \* $P < 0.05$  frente a miocitos infectados con GFP y # $P < 0.05$  frente a miocitos infectados con Nav1.5 WT.

En los miocitos de rata la  $I_{K1}$  es generada mayoritariamente por canales Kir2.1, pero, lo más importante es que los canales Kir2.3 no participan en su génesis. Por tanto, de acuerdo con los resultados publicados por nuestro grupo (Matamoros y cols., 2016) esperábamos que la sobreexpresión de canales Nav1.5 en los miocitos de rata diera lugar a un aumento

significativo de la  $I_{K1}$ . Como se puede observar en la Figura IV.11, la infección de los miocitos con Ad-Nav1.5 daba lugar a un aumento significativo de la densidad de la  $I_{K1}$  ( $n \geq 12$ ,  $P < 0.05$ ). La  $I_{K1}$  registrada en miocitos infectados con Ad-p.D1690N no fue diferente de la generada por los miocitos control pero sí era inferior a la  $I_{K1}$  registrada en miocitos que sobreexpresaban Nav1.5 WT (Ad-Nav1.5). Estos resultados confirman los obtenidos en células CHO indicando que los canales p.D1690N no modulan positivamente la  $I_{K1}$ . Por el contrario, la infección de los miocitos tanto con Ad-p.G1748D como con Ad-p.D1816VfsX7 disminuye significativamente la densidad de la  $I_{K1}$  comparada con la registrada en los miocitos control ( $n \geq 11$ ,  $P < 0.05$ ) (Figura IV.11). Estos resultados sugieren que tanto p.G1748D como p.D1816VfsX7 son capaces de interferir/afectar la expresión de los canales Kir2.1 WT, es decir, que ejercen un EDN sobre ellos.

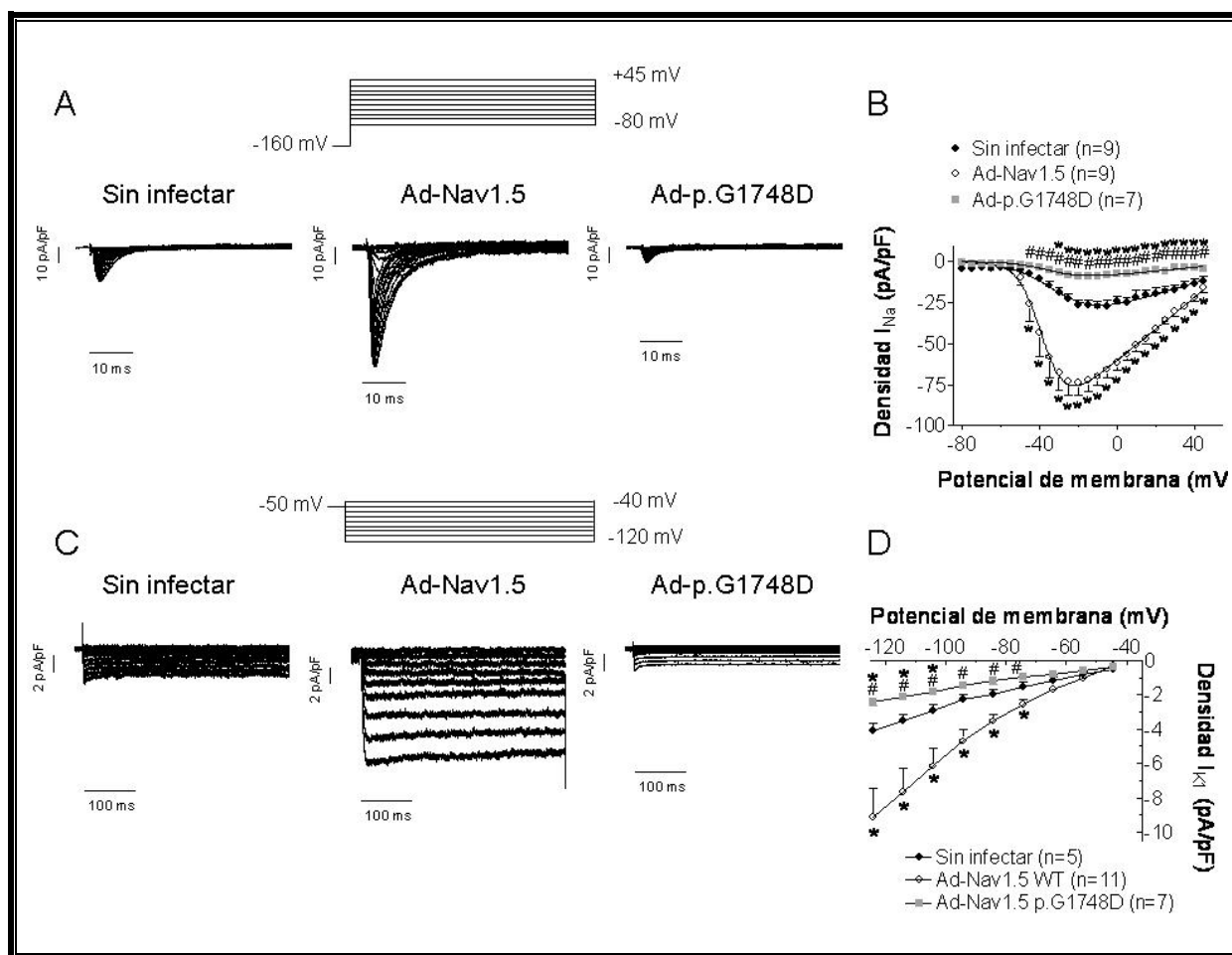
De los resultados obtenidos en células CHO así como en miocitos de rata infectados con los mutantes que producen déficit de función deducimos que en los miocitos de los pacientes portadores de mutaciones en canales Nav1.5 que impiden su expresión en membrana, se producirá una disminución significativa de la densidad tanto de la  $I_{Na}$  como de la  $I_{K1}$ . Más aún, en el caso de algunas mutaciones del canal Nav1.5 como p.G1748D o p.D1816VfsX7, la disminución de la  $I_{K1}$  será aún más intensa puesto que estos mutantes producen un EDN sobre los canales Kir2.1 no descrito hasta la fecha.

#### **2.4. La mutación p.G1748D produce EDN sobre la $I_{K1}$ e $I_{Na}$ en hiPSC-CM**

Por razones éticas, en este momento no podemos disponer de miocitos ventriculares humanos procedentes de corazones sanos. Sin embargo, y para descartar la posibilidad de que los resultados observados con los mutantes no fuesen modelo-dependiente, realizamos una serie de experimentos de patch-clamp en cardiomiocitos diferenciados a partir de células humanas pluripotentes inducidas (hiPSC-CM *cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells*). Dado que nuestro grupo no tenía experiencia en la maduración y manejo de los hiPSC-CM estos experimentos lo realizamos en el laboratorio del Prof. Jalife (*Center of Arrhythmia Research*, University of Michigan, Ann Arbor, USA) quien recientemente había descrito los protocolos óptimos de maduración de hiPSC para rendir las células con un fenotipo más próximo al de los cardiomiocitos ventriculares humanos (Terron y cols., 2016). Una vez los hiPSC-CM habían sido madurados, procedimos a su infección con las partículas adenovirales utilizadas en los miocitos de rata. Registramos la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  en tres

grupos de hiPSC-CM, aquellas que no fueron infectadas (Control), las que fueron infectadas con Ad-Nav1.5, y por último las que fueron infectadas con Ad-p.G1748D. El mutante p.G1748D fue seleccionado por el marcado EDN que produce tanto sobre la  $I_{Na}$  como sobre la  $I_{K1}$ . Cabe mencionar que la disponibilidad de los hiPSC-CM es limitada dada la complejidad y coste de los procesos de maduración, lo que nos obligó a seleccionar solo uno de los mutantes del canal Nav1.5 para realizar este grupo de experimentos.

En la Figura IV.12A se muestran, como ejemplo representativo, las familias de trazos de  $I_{Na}$  registradas en tres grupos de hiPSC-CM, una no infectada y otras dos infectadas con los adenovirus que codificaban Nav1.5 WT y p.G1748D, respectivamente. En la Figura IV.12B se muestran las relaciones densidad de corriente-voltaje obtenidas en los tres grupos de células. Los miocitos derivados de hiPSC en los que se sobreexpresaba Nav1.5 WT la densidad de la  $I_{Na}$  aumentaba hasta triplicarse (Figuras IV.12A y B) ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, la infección con el mutante Ad-p.G1748D reducía marcadamente la densidad de la  $I_{Na}$  de forma que no solo era significativamente menor a la generada en hiPSC-CM infectados con Ad-Nav1.5, sino que a todos los potenciales de membrana estudiados también era menor a la  $I_{Na}$  generada en cardiomiocitos humanos no infectados (Control) (Figuras IV.12A y B). Es decir, que en los hiPSC-CM se confirma que el mutante p.G1748D produce un EDN sobre los canales Nav1.5 WT tal y como se había observado en sistemas heterólogos de transfección (Núñez y cols, 2013) y en miocitos ventriculares de rata.



**Figura IV.12. La expresión del mutante p.G1748D disminuye la  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$  en hiPSC-CM.** (A) y (C) Familia de trazos representativa de  $I_{Na}$  (A) e  $I_{K1}$  (C) registrados en hiPSC-CM control o infectados con Ad-Nav1.5 WT o con el mutante Ad-p.G1748D tras aplicar el protocolo de pulsos mostrado arriba. (B) y (D) Relaciones I-V para  $I_{Na}$  (B) o  $I_{K1}$  (D) en células sin infectar o infectadas con Ad-Nav1.5 o Ad-p.G1748D. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 5$  experimentos. \* $P < 0.05$  frente a hiPSC-CM sin infectar y # $P < 0.05$  frente a Ad-Nav1.5.

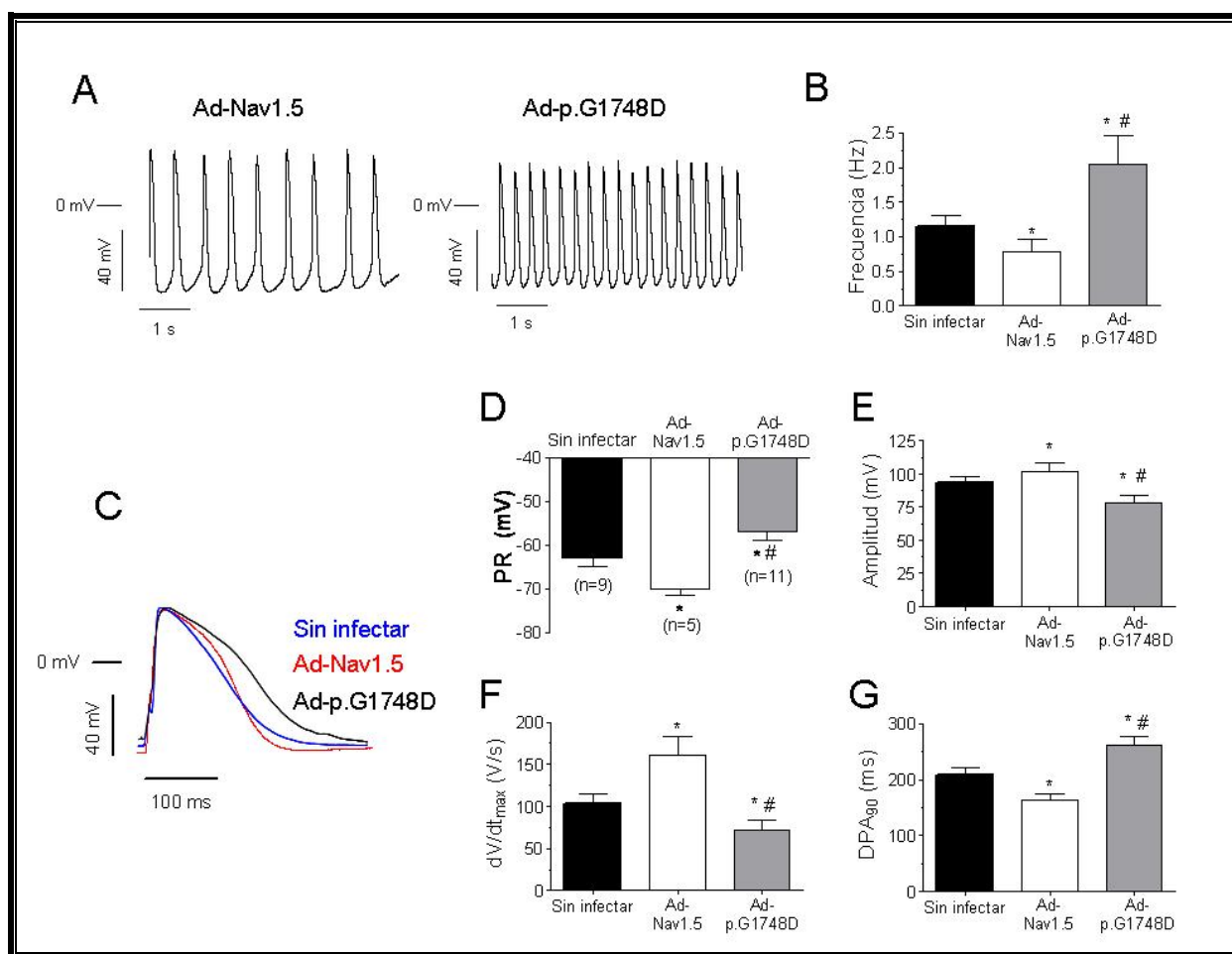
La Figura IV.12C muestra familias de trazos representativas de la corriente generada al aplicar el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior. Como se puede observar al aplicar pulsos hiperpolarizantes se genera una corriente de entrada, de activación prácticamente instantánea cuya amplitud disminuye a medida que el potencial de membrana del pulso se hace menos negativo. En la relación densidad de corriente-voltaje se puede apreciar que la corriente registrada presenta una marcada rectificación interna. Estas características indican que se trata de la  $I_{K1}$  o corriente sensible al ión  $Ba^{2+}$ . Sin embargo, no podemos descartar que la corriente de  $Na^+$  y  $K^+$  activada con la hiperpolarización que participa en la actividad marcapasos ( $I_f$ ) también contribuyera a la densidad de la corriente total registrada. Como se puede observar en la Figuras IV.12C y D la sobreexpresión de Nav1.5 WT produce una densidad de  $I_{K1}$  de  $8.1 \pm 1.6$  pA/pF a -120 mV ( $n=11$ ), lo que supone

un aumento de más del 130% de la corriente nativa de  $I_{K1}$  ( $P < 0.05$ ). Se trata por tanto de la confirmación, en cardiomiocitos de origen humano, de que los canales Nav1.5 y Kir2.1 se modulan de forma recíproca. Sin embargo, en hiPSC infectadas con Ad-p.G1748D la densidad de la  $I_{K1}$  es significativamente menor a la registrada no solo en cardiomiocitos infectados con Ad-Nav1.5, sino también menor a la de la  $I_{K1}$  nativa registrada en hiPSC sin infectar ( $2.6 \pm 0.26$  pA/pF,  $P < 0.05$ ) (Figura IV.12D). Por tanto, se confirma que en hiPSC-CM el mutante p.G1748D del canal de Nav1.5 se comporta como dominante negativo tanto sobre canales Nav1.5 como sobre canales Kir2.1, lo que valida los resultados obtenidos previamente.

Además, se registraron PA en hiPSC para analizar las consecuencias electrofisiológicas de la sobreexpresión de canales Nav1.5 tanto nativos como p.G1748D. Aunque los protocolos de maduración han ido perfeccionándose paulatinamente todavía no son óptimos. De hecho, los cardiomiocitos derivados de hiPSC presentan actividad automática a una frecuencia de disparo de  $1.1 \pm 0.1$  Hz ( $n=6$ ) (Figura IV.13B). La sobreexpresión de Nav1.5 WT disminuyó significativamente la frecuencia de la actividad automática ( $n=7$ ,  $P < 0.05$ ) (Figuras IV.13A izquierda y 13B). Esta disminución de la frecuencia de la actividad automática se explica por el aumento de la  $I_{K1}$  que es la corriente que mantiene el Em isoelectrico durante la fase 4 de los potenciales de acción (ver Introducción). Como puede verse en el panel derecho de la Figura IV.13A la infección con Ad-p.G1748D aumenta la inclinación de la fase 4 del PA incrementando por tanto la frecuencia de la actividad automática que alcanzó una frecuencia de  $2.0 \pm 0.4$  Hz ( $n=7$ ;  $P < 0.05$ ).

En la Figura IV.13C, se muestran los trazos superpuestos de los potenciales de acción registrados en tres grupos de hiPSC, una de las cuales no había sido infectada mientras que las otras dos habían sido infectadas con Ad-Nav1.5 y Ad-p.G1748D, respectivamente. En este grupo de experimentos los cardiomiocitos fueron estimulados a la frecuencia de 1 Hz. Se puede observar que la estimulación abole por sobreestimulación (Krellenstein y cols., 1978) la actividad automática de los cardiomiocitos derivados de hiPSC. En estas condiciones experimentales, la infección con Ad-Nav1.5 aumentó significativamente la amplitud de los potenciales de acción (APA) (Figura IV.13E) y la velocidad máxima de despolarización ( $dV/dt_{max}$ ) (panel F). Ambos efectos se explican por el aumento de la  $I_{Na}$  provocado por la sobreexpresión de canales Nav1.5. Además, la infección con Ad-Nav1.5 hiperpolariza

significativamente el potencial de reposo (Figura IV.13D) y abrevió la DPA medida al 90% de la repolarización (DPA<sub>90</sub>) (panel G). Estos dos efectos son consecuencia del aumento de la  $I_{K1}$  inducido por la sobreexpresión de canales Nav1.5 WT. Por el contrario, los potenciales de acción registrados en células infectadas con el mutante de Ad-p.G1748D presentaban una APA (panel E) y  $dV/dt_{max}$  (panel F) significativamente menores a la de los potenciales registrados en células tanto infectadas como no infectadas con Ad-Nav1.5. Además los hiPSC-CM en los que se sobreexpresó p.G1748D generaban potenciales de acción con un potencial de reposo significativamente despolarizado y una duración significativamente más prolongada (Figuras IV.13D y G).



**Figura IV.13. El mutante p.G1748D modifica significativamente las propiedades del potencial de acción en hiPSC-CM.** (A) Serie de PAs espontáneos registrados en hiPSC-CM infectados con Ad-Nav1.5 (a la izquierda) o Ad-p.G1748D (derecha). (B) Frecuencias (en Hz) medias registradas en hiPSC sin infectar o infectadas con Nav1.5 WT o Nav1.5 p.G1748D. (C) Trazos representativos de PAs superpuestos registrados a 1 Hz en hiPSC-CM sin infectar (azul) o infectados con Ad-Nav1.5 (rojo) o Ad-p.G1748D (negro). (D-G) Potencial de reposo (PR) (D), amplitud (E),  $dV/dt_{max}$  (F) y DPA<sub>90</sub> (G) de los PAs registrados a 1 Hz en hiPSC-CM sin infectar o infectados con Ad-Nav1.5 o Ad-p.G1748D. Las barras representan la media±EEM de “n” experimentos. \*P<0.05 frente a hiPSC-CM sin infectar y #P<0.05 frente a Ad-Nav1.5.

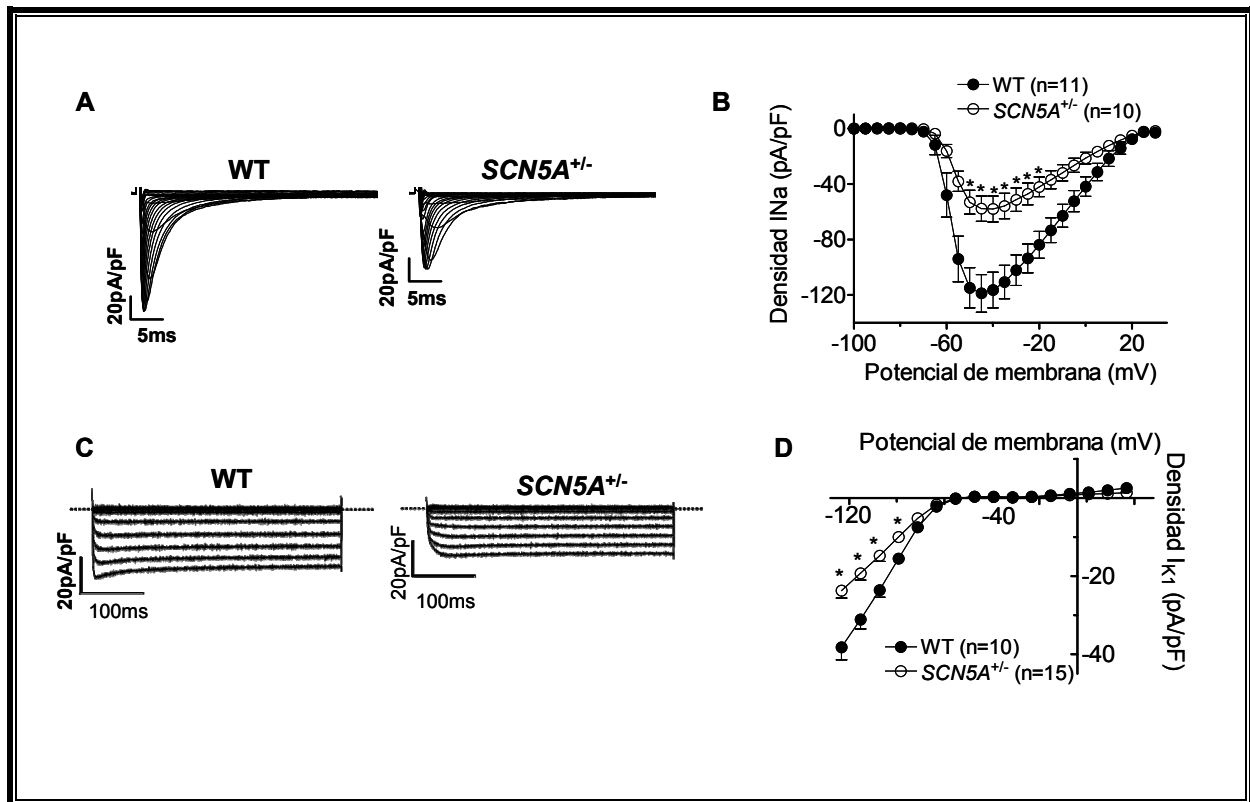
Estos resultados confirman que el mutante p.G1748D produce un EDN sobre los canales Kir2.1 en hiPSC-CM lo que explica la reducción de la  $I_{K1}$ , la despolarización del potencial de reposo, el aumento de la frecuencia de disparo, y la prolongación de la DPA medida al final de la repolarización.

## 2.5. Modulación recíproca positiva en un cruce de ratones transgénicos *KCNJ2* OE<sup>+/-</sup>-*SCN5A*<sup>+/-</sup>

A continuación quisimos explorar las consecuencias de la disminución y/o aumento de la expresión de canales Nav1.5 y Kir2.1 en sistemas más complejos y por ello, en colaboración con el Dr Willis-Pineda del grupo del Prof. Jalife, recurrimos a la utilización y creación de ratones genéticamente modificados. Estos experimentos no nos permitirán analizar las consecuencias de la presencia de mutantes con déficit de función de los canales Nav1.5, pero sí descartar que la modulación recíproca positiva entre  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$  fuese un artefacto de los sistemas de sobreexpresión.

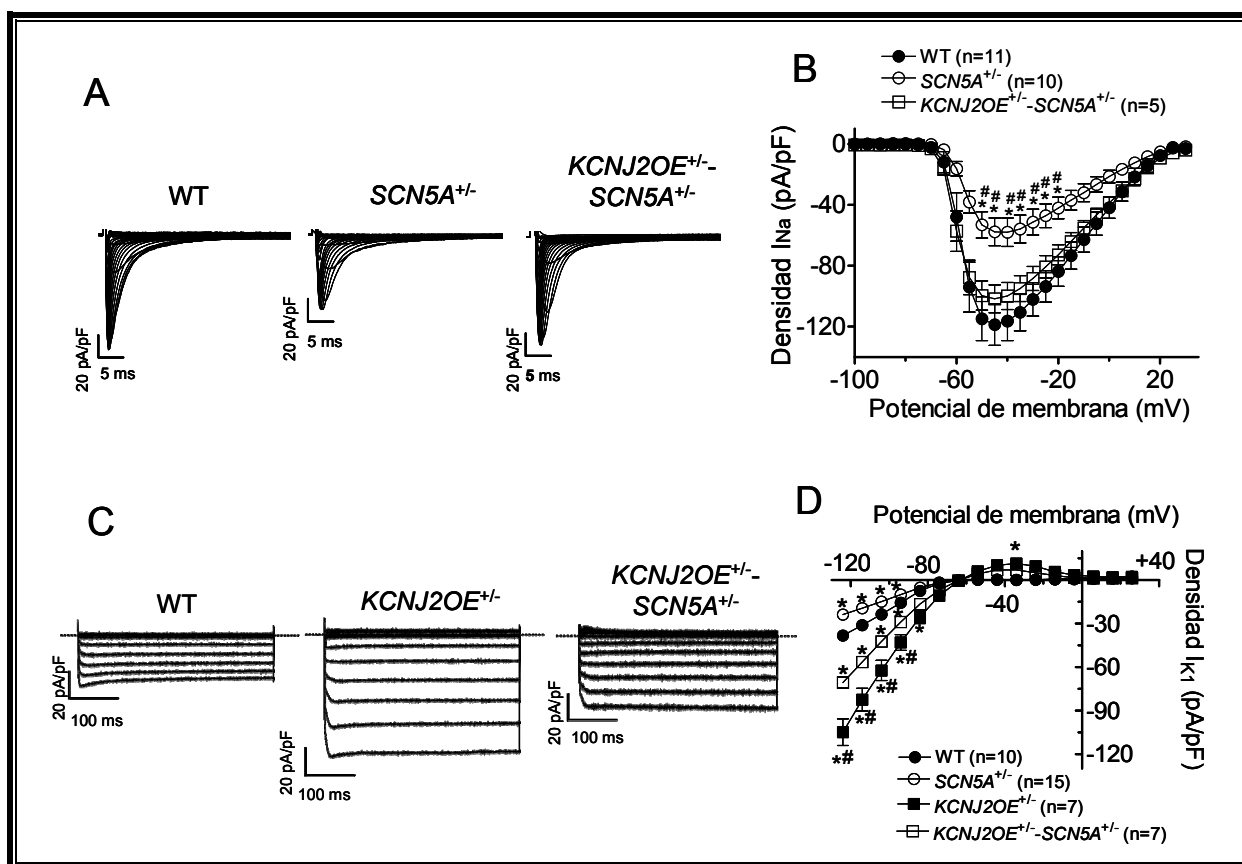
En primer lugar, realizamos experimentos en miocitos ventriculares procedentes de ratones ya previamente utilizados y caracterizados como modelo del SBr (Martin y cols., 2010). Se trataba de ratones macho en los que se había suprimido la expresión de uno de los alelos del gen *SCN5A* (*SCN5A*<sup>+/-</sup>). En la Figura IV.14A, se muestran familias de trazos de la  $I_{Na}$  registradas en miocitos ventriculares de ratón no modificado genéticamente (WT) así como en miocitos de ratón *SCN5A*<sup>+/-</sup>. Como era de esperar, la falta de uno de los alelos del gen que codifica los canales Nav1.5 disminuye la amplitud de la  $I_{Na}$ . De hecho, en la relación corriente voltaje que se representa en la Figura IV.14B se puede observar que la disminución de la  $I_{Na}$  es de aproximadamente un 50% a todos los potenciales de membrana estudiados (N=4, n=10,  $P < 0.05$ ) (Figura IV.14B).





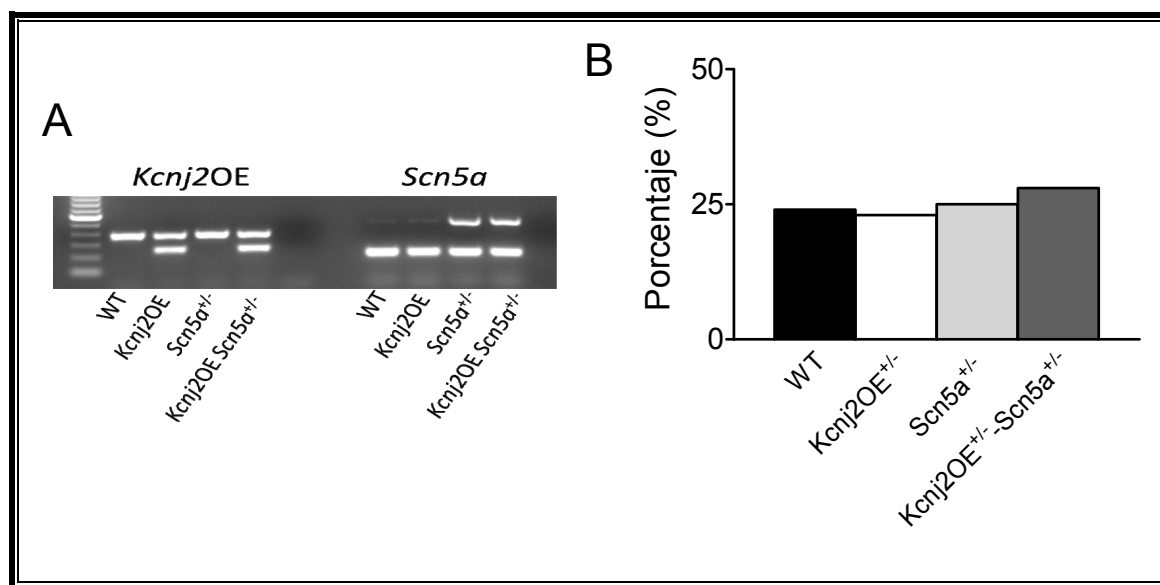
**Figura IV.14. Características electrofisiológicas de miocitos de ratones *SCN5A*<sup>+/-</sup>.** (A) Familia de trazos representativa de  $I_{Na}$  registrada en miocitos ventriculares disociados de ratones WT y de ratones *SCN5A*<sup>+/-</sup>. (B) Relaciones I-V para  $I_{Na}$  registradas en miocitos ventriculares disociados de ratón WT y *SCN5A*<sup>+/-</sup>. (C) Familia de trazos representativa de  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares disociados de ratones WT y de ratones *SCN5A*<sup>+/-</sup>. (D) Relaciones I-V para  $I_{K1}$  registradas en miocitos ventriculares disociados de ratón WT y *SCN5A*<sup>+/-</sup>, \* $P < 0.05$  frente a ratones WT.

La Figura IV.14C muestra familias de trazos de la  $I_{K1}$  registrados en sendos miocitos ventriculares procedentes de ratones control y *SCN5A*<sup>+/-</sup>. Lo más importantes es que la densidad de la  $I_{K1}$  en los miocitos de los ratones del modelo de SBr era menor que en la de los miocitos de ratones WT. En la Figura IV.14D se representa la relación corriente voltaje que demuestra que la  $I_{K1}$  en ratones *SCN5A*<sup>+/-</sup> era un 40% inferior a la registrada en ratones WT a todos los potenciales de membrana ensayados ( $N=4$ ,  $n=15$ ,  $P < 0.05$ ). Estos resultados confirman que existe una relación funcional entre los canales Nav1.5 y Kir2.1 que puede estar relacionado con un mecanismo de regulación recíproca común.



**Figura IV.15.** El cruzamiento de ratones  $SCN5A^{+/-}$  con ratones con Kir2.1 sobreexpresado recupera las corrientes  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$  que se veían disminuidas en los miocitos de ratones  $SCN5A^{+/-}$ . (A) Familia de trazos representativa de  $I_{Na}$  registrados en miocitos ventriculares disociados de ratón WT,  $SCN5A^{+/-}$  o  $KCNJ2OE^{+/-}SCN5A^{+/-}$ . (B) Relaciones I-V para  $I_{Na}$  registradas en miocitos ventriculares disociados de ratón WT,  $SCN5A^{+/-}$  o  $KCNJ2OE^{+/-}SCN5A^{+/-}$ . (C) Familia de trazos representativa de  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares disociados de ratón WT,  $KCNJ2OE^{+/-}$  o  $KCNJ2OE^{+/-}SCN5A^{+/-}$ . (D) Relaciones I-V para  $I_{K1}$  registradas en miocitos ventriculares disociados de ratón WT,  $KCNJ2OE^{+/-}$  o  $KCNJ2OE^{+/-}SCN5A^{+/-}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 5$  células. Las “n” representan el número de células de cada grupo. \*  $P < 0.05$  frente a ratón WT y #  $P < 0.05$  frente a ratón  $KCNJ2OE^{+/-}SCN5A^{+/-}$ .

Piao y colaboradores generaron y describieron un modelo de ratón modificado genéticamente que sobreexpresa uno de los alelos del gen que codifica los canales Kir2.1 ( $KCNJ2 OE^{+/-}$ ) (Piao y cols., 2007b). La familia de trazos de  $I_{K1}$  registrada en miocitos ventriculares de ratones  $KCNJ2 OE^{+/-}$  y la relación corriente voltaje de la corriente mostrada en la Figura IV.15C y D, demuestran que en estos ratones la densidad de la  $I_{K1}$  se duplica con respecto a la  $I_{K1}$  registrada en ratones WT ( $N=3$ ,  $n=7$ ,  $P < 0.05$ ). A continuación se generó una nueva estirpe de ratones obtenida por el cruce de los ratones  $KCNJ2 OE^{+/-}$  con los  $SCN5A^{+/-}$  (ratones  $KCNJ2OE^{+/-}SCN5A^{+/-}$ ). La Figura IV.16 muestra un gel de agarosa con los resultados de la PCR de los cuatro perfiles genéticos obtenidos tras cruzar ratones  $SCN5A^{+/-}$  con ratones  $KCNJ2OE^{+/-}$ . Se observa una herencia mendeliana con un 25% de probabilidad de obtener cada uno de los cuatro grupos posibles tras el cruzamiento.



**Figura IV.16. Cruzamiento de ratones *SCN5A*<sup>+/-</sup> con ratones *KCNJ2OE*<sup>+/-</sup>.** (A) Perfil de los resultados de la PCR en los cuatro grupos de ratones (WT y transgénicos) obtenidos tras el cruzamiento de ratones *SCN5A*<sup>+/-</sup> con ratones *KCNJ2OE*<sup>+/-</sup> usando primers específicos para detectar *KCNJ2* (a la izquierda) y *SCN5A* (derecha). La sobreexpresión de *KCNJ2* fusionado a GFP, que genera una banda adicional de 260 pb en el gel, se observa solo en ratones *KCNJ2OE*<sup>+/-</sup> y en ratones *KCNJ2OE*<sup>+/-</sup>*-SCN5A*<sup>+/-</sup>; mientras que el fragmento de 386 pb correspondiente a *KCNJ2* nativo aparece en los cuatro grupos. Por otro lado, *SCN5A* se elimina mediante inserción de un segmento LacZ/GFP entre dos sitios loxP. Esto genera una banda adicional de 500 pb solo en los ratones *SCN5A*<sup>+/-</sup> y *KCNJ2OE*<sup>+/-</sup>*-SCN5A*<sup>+/-</sup>. Al contrario, el fragmento de 200 pb que corresponde a *SCN5A* se amplificó en los cuatro grupos. (B) Se observa una herencia mendeliana entre los cuatro grupos de ratones obtenidos tras el cruzamiento de ratones *SCN5A*<sup>+/-</sup> con ratones *KCNJ2OE*<sup>+/-</sup> (N=88 ratones obtenidos tras el cruce).

La pregunta que pretendíamos responder utilizando estos ratones era si la sobreexpresión de canales Kir2.1 podría restaurar la amplitud de la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  disminuidas por la ausencia de uno de los alelos del gen *SCN5A*. La Figura IV.15C muestra familias de trazos de corriente  $I_{K1}$  registradas en miocitos de ratones *KCNJ2OE*<sup>+/-</sup>*-SCN5A*<sup>+/-</sup>. Como se puede observar, en el ratón *KCNJ2OE*<sup>+/-</sup>*-SCN5A*<sup>+/-</sup>, la densidad de  $I_{K1}$  disminuye significativamente con respecto a la de ratones *KCNJ2OE*<sup>+/-</sup> (N=3, n=7,  $P < 0.05$ ) pero aumenta significativamente con respecto a la generada en los miocitos de ratones *SCN5A*<sup>+/-</sup> ( $P < 0.05$  frente a *SCN5A*<sup>+/-</sup>); aunque no es capaz de restaurar la corriente  $I_{K1}$  a niveles de ratones WT ( $P < 0.05$  frente a WT) (Figura IV.15D). Respecto a la densidad de corriente  $I_{Na}$ , la corriente generada por miocitos de ratones *KCNJ2OE*<sup>+/-</sup>*-SCN5A*<sup>+/-</sup> fue similar a la generada en miocitos de ratones WT (Figuras IV.15A y B), lo que significa que la sobreexpresión de Kir2.1 es capaz de compensar la disminución de Nav1.5.

### 3. POSIBLE MECANISMO RESPONSABLE DE LA VARIABILIDAD DE EFECTOS SOBRE LA MODULACIÓN POSITIVA OBSERVADA ENTRE LAS MUTACIONES DEL CANAL Nav1.5 ESTUDIADAS

Los resultados sugieren que los mutantes del canal Nav1.5 que no trafican adecuadamente a la membrana celular o bien no son capaces de modular positivamente la  $I_{K1}$ , como en el caso del p.D1690N, o bien producen EDN sobre dicha corriente, como ocurre con p.G1748D y p.D1816VfsX7. La cuestión que nos planteamos a continuación fue cual era el mecanismo biológico responsable de este distinto patrón de comportamiento para predecir como afectará cada mutación a la modulación positiva. Podría ocurrir que la diferencia entre un tipo de mutantes y el otro fuera el compartimento intracelular en el que se queda atrapado. De tal manera que los mutantes que se quedan retenidos en el RE o bien los que quedan en el Golgi fueran los que producen EDN sobre la corriente  $I_{K1}$ .

#### 3.1. Relación entre el efecto producido por los distintos mutantes del canal Nav1.5 sobre la $I_{K1}$ y el compartimento intracelular donde se quedan retenidos

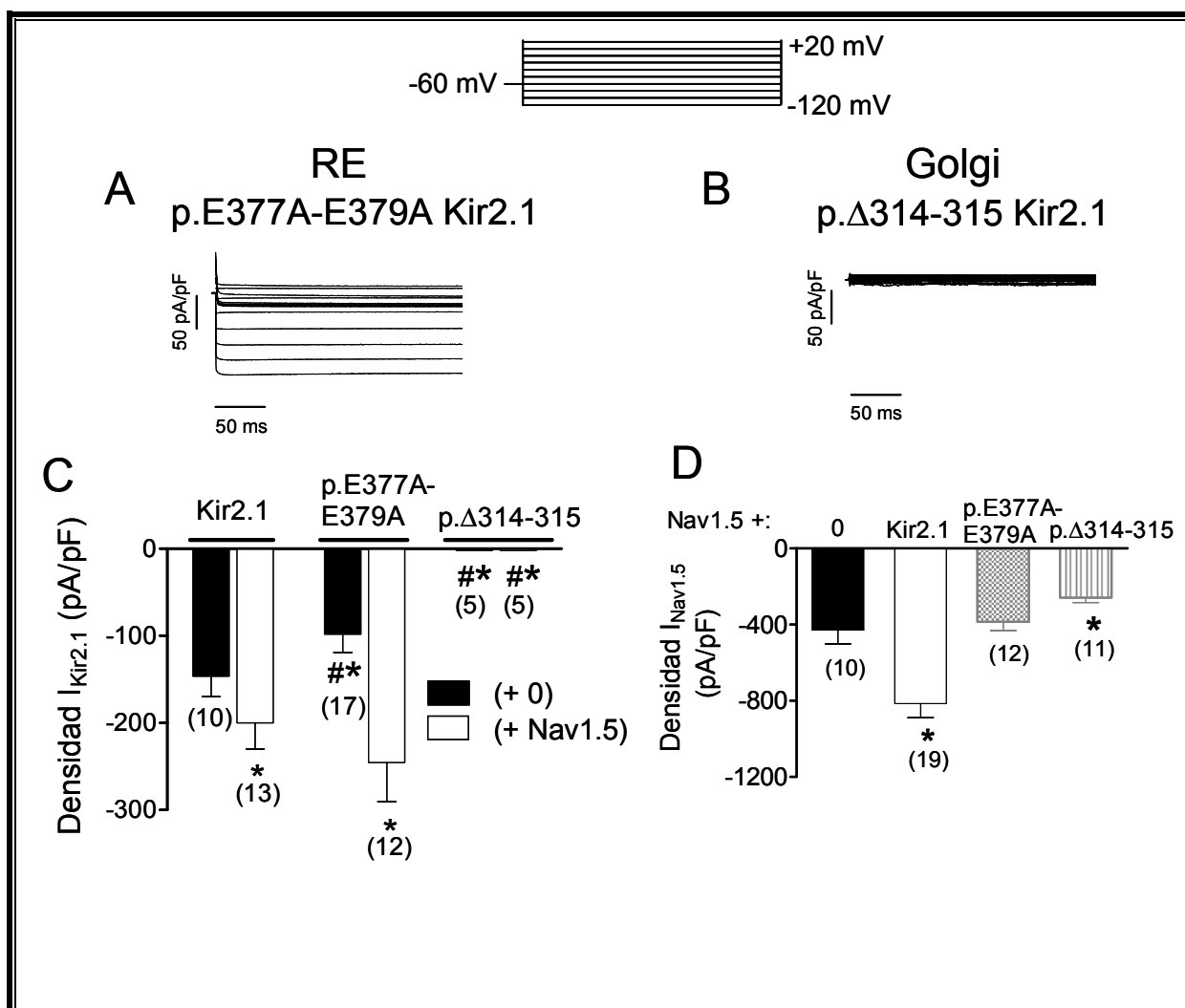
##### 3.1.1. Efecto de mutaciones en el canal Kir2.1 sobre la modulación positiva de la $I_{Nav1.5}$

Para responder esta pregunta, utilizamos mutantes de los canales Kir2.1 en las secuencias que actúan como señales de salida bien del RE o bien del Golgi. La secuencia 374-FCYENE-379 de Kir2.1 constituye la señal de salida del RE y mutaciones en algún residuo de este dominio promueve la retención del canal en el RE (Ma y cols., 2001). Por otro lado, se ha demostrado que el mutante p.Δ314-315 del canal Kir2.1 no llega a expresarse en membrana ya que se queda atrapado/retenido en el aparato de Golgi, generando SAT (Ma y cols., 2011). La Figuras IV.17A y 14B muestra familias de trazos de corriente generados por los mutantes de Kir2.1 p.E377A-E379A y p.Δ314-315, respectivamente. Los registros se realizaron en células CHO transfectadas transitoriamente con el ADNc de cada uno de los mutantes utilizando el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior. El mutante p.Δ314-315 no genera corriente porque queda completamente atrapado en el Golgi (Figuras IV.17B y C) mientras que el mutante p.E377A-E379A, retenido en RE, genera una  $I_{Kir2.1}$  significativamente menor a la generada por los canales Kir2.1 WT (Figura 17A y C) ( $P < 0.05$ ). La Figura IV.17C describe la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  a -120 mV generada por los canales Kir2.1

WT y los mutantes p.E377A-E379A y p.Δ314-315 cuando las células eran cotransfectadas o no con canales Nav1.5 WT. Como se puede observar la cotransfección con canales Nav1.5 aumentó de forma significativa la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  generada por los canales Kir2.1 tanto WT como p.E377A-E379A (Figura IV.17C). Por el contrario, la cotransfección con canales Nav1.5 no aumentó la densidad de la  $I_{Kir2.1}$  generada por los canales p.Δ314-315 (Figura IV.17C). Este resultado sugiere que los canales Nav1.5 son capaces de “rescatar” a los canales Kir2.1 que quedan atrapados en el RE pero no aquellos que quedan retenidos en el Golgi.

En la Figura IV.17D se representa la densidad del pico máximo de la  $I_{Nav1.5}$  generada en células CHO por canales Nav1.5 cotransfectados o no con canales Kir2.1 WT o mutados en las señales de salida del RE o del Golgi. Se puede observar que los canales Kir2.1 p.E377A-E379A no modulan positivamente la  $I_{Nav1.5}$  dado que la corriente generada no es distinta a la registrada por los canales Nav1.5 solos. Sin embargo, la cotransfección con canales Kir2.1 p.Δ314-315 disminuye significativamente la densidad de la  $I_{Nav1.5}$  con respecto a la generada por canales Nav1.5 solos ( $n \geq 10$ ,  $P < 0.05$ ).

Estos resultados indican que estos mutantes de Kir2.1 que quedan atrapados en el RE o el Golgi no son capaces de modular positivamente la  $I_{Nav1.5}$ . Más aún el resultado demuestra que el canal Kir2.1 que queda retenido en el Golgi (p.Δ314-315) produce una disminución adicional de la  $I_{Nav1.5}$  atrapando a los canales Nav1.5 e impidiendo que estos lleguen a la membrana, es decir, produce un EDN.



**Figura IV.17. Los mutantes del canal Kir2.1 producen diferentes efectos sobre la modulación positiva según si se quedan retenidos en el RE (p.E377A-E379A) o en el aparato de Golgi (p.Δ314-315).** (A) y (B) Familia de trazos representativa generada con el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior de la Figura en células CHO transfectadas con p.E377A-E379A (panel A) o con p.Δ314-315 (panel B). (C) Densidades de  $I_{Kir2.1}$  a -120 mV generadas en canales Kir2.1 WT o mutantes solos o cotransfectados con canales Nav1.5. (D) Densidades máximas de  $I_{Nav1.5}$  generadas en canales Nav1.5 WT solos o cotransfectados con canales Kir2.1 WT o mutantes. \*  $P < 0.05$  frente a Kir2.1 o Nav1.5 solos; #  $P < 0.05$  frente a Kir2.1+Nav1.5.

3.1.2. El mutante del canal Nav1.5 p.D1690N queda retenido en el RE mientras que p.G1748D en el Golgi

#### 3.1.2.a. Mecanismos de rescate de mutantes

Los resultados obtenidos con los canales Kir2.1 sugieren que aquellos mutantes que no trafican a la membrana por quedar retenidos en el RE no son capaces de modular

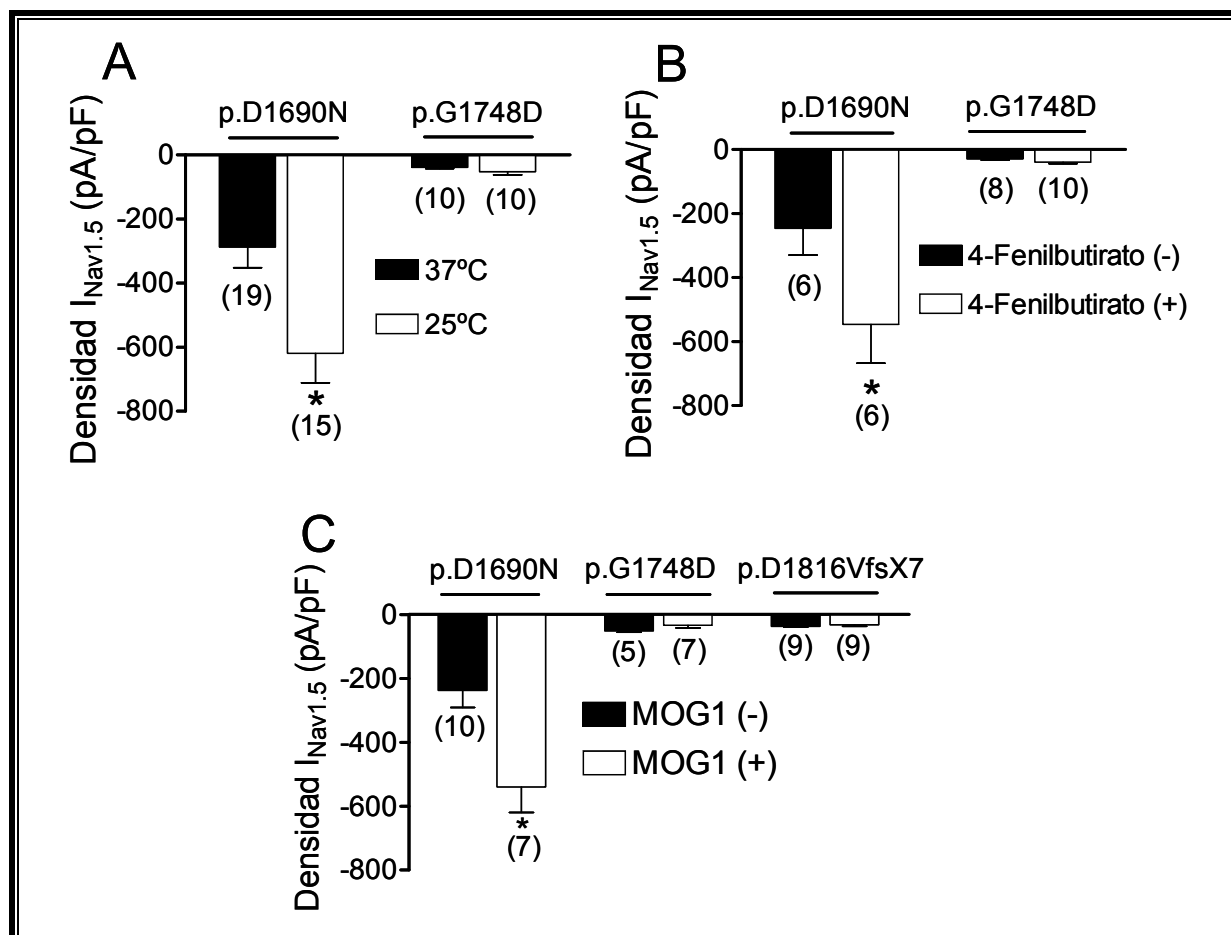
positivamente a los canales Nav1.5 y que aquellos que quedan retenidos en el Golgi atrapan con ellos a los canales Nav1.5 produciendo una disminución adicional de la corriente. Quisimos analizar si también para los canales Nav1.5 existe esta correlación entre el lugar de retención del mutante y el efecto que produce sobre la modulación positiva. Sin embargo, desconocíamos donde se retenían los mutantes del canal Nav1.5 estudiados, p.D1960N, p.G1748D, y p.D1816VfsX7.

Se ha descrito que los mutantes de los canales retenidos en el RE se pueden rescatar mediante incubación de las células a temperatura ambiente o con chaperonas químicas como el 4-fenilbutirato principalmente porque interrumpen el sistema de control de calidad del RE (Egan y cols., 2002; Rajamani y cols., 2002). Resultados previos en nuestro laboratorio ya demostraron que la expresión en la membrana del mutante p.D1816VfsX7 no se modifica con ninguna de estas maniobras (Dolz-Gaitón y cols., 2013), lo que sugiere que dicho mutante queda retenido en el Golgi. Por tanto, a continuación estudiamos si los mutantes p.D1690N y p.G1748D se quedan retenidos en el RE o en el Golgi. En la Figura IV.18 se muestra la densidad del pico máximo de la  $I_{Nav1.5}$  generada por canales p.D1690N y p.G1748D en células CHO que fueron incubadas a temperatura ambiente (panel A) o en presencia de 4-fenilbutirato (panel B). Los resultados demuestran que la densidad de  $I_{Nav1.5}$  generada por el mutante p.D1690N, pero no la generada por el mutante p.G1748D, aumentó significativamente cuando las células se incuban a temperatura ambiente (25°C en vez de 37°C) (Figura IV.18A) o en presencia de 4-fenilbutirato (5 mM) durante 24 h (Figura IV.18B). Estos datos sugieren que el canal p.D1690N se queda retenido en el RE mientras que el canal p.G1748D en el Golgi.

De manera adicional, se analizaron los efectos de MOG1. MOG1 es un factor liberador de nucleótido de guanina para RAN que interacciona con canales Nav1.5 aumentando su expresión en la membrana (Wu y cols., 2008). Además, se ha demostrado recientemente que MOG1 es capaz de reestablecer el tráfico de aquellos mutantes de Nav1.5 que quedan atrapados en el RE (Chakrabarti y cols., 2013). La Figura IV.18C demuestra que la cotransfección con MOG1 aumenta de manera significativa y selectiva la densidad de  $I_{Nav1.5}$  generada por canales p.D1690N pero no modula la  $I_{Nav1.5}$  generada por canales p.G1748D y p.D1816VfsX7.

Por tanto, los resultados indican que el canal p.D1690N se queda retenido en el RE mientras que los canales p.G1748D y p.D1816VfsX7 en el Golgi. Es más, respaldan la hipótesis de que los mutantes del canal Nav1.5 que quedan atrapados en el RE son los que solo suprimen la

modulación recíproca positiva sobre la  $I_{K1}$  mientras que los mutantes que quedan retenidos en el Golgi producen EDN sobre la corriente  $I_{K1}$ .



**Figura IV.18. Discriminación del compartimento intracelular en el que quedan retenidos los mutantes del canal Nav1.5 estudiados.** (A) y (B) Densidad del pico máximo de la  $I_{Nav1.5}$  generada por canales p.D1690N y p.G1748D incubados a 37°C o a 25°C (panel A) o en ausencia y presencia de 4-Fenilbutirato (panel B). (C) Densidad máxima  $I_{Nav1.5}$  generada por canales p.D1690N, p.G1748D o p.D1816VfsX7 cotransfectados o no con MOG1. Cada barra representa la media $\pm$ EEM de (n) células. \*  $P < 0.05$  frente a p.D1690N sin tratamiento.

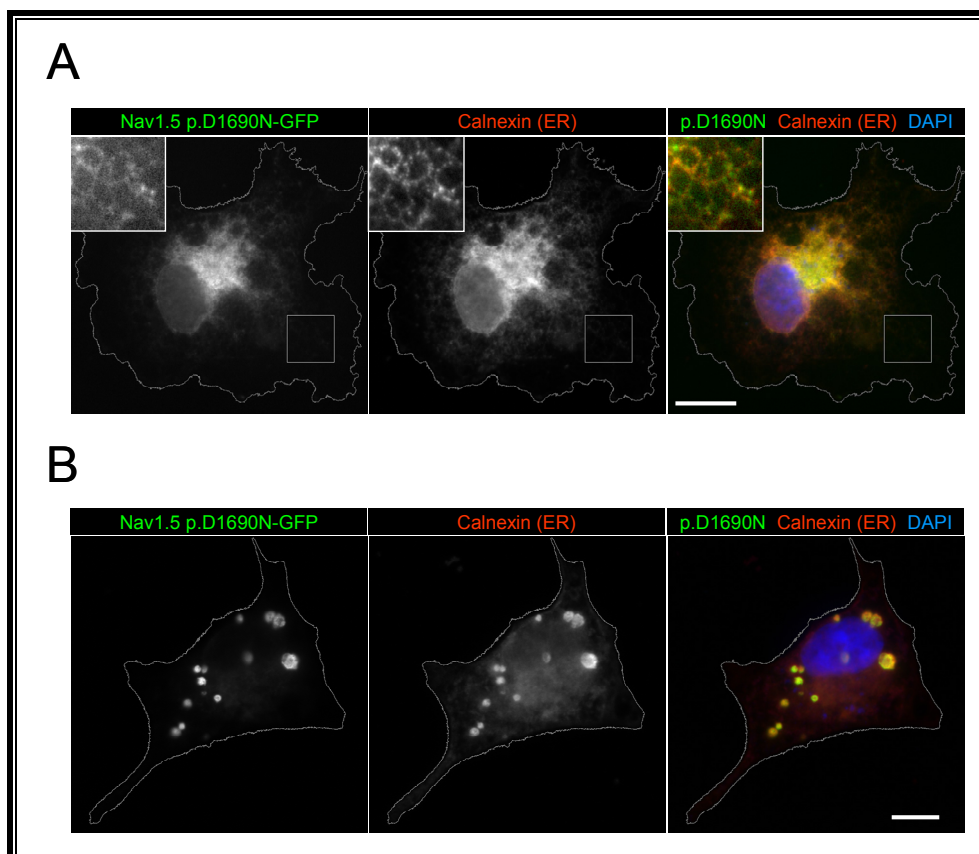
### 3.1.2.b. Inmunofluorescencia de los mutantes p.D1690N y p.G1748D

Para cerciorarnos de la localización intracelular de los mutantes p.D1690N y p.G1748D, realizamos experimentos de inmunofluorescencia en células COS-7 transfectadas con los canales mutantes y con marcadores de RE o Golgi.

La Figura 19A y B muestra la distribución intracelular del canal p.D1690N en dos células diferentes. Se observa un alto grado de colocación de este mutante con la Calnexina, chaperona residente en el RE, lo que sugiere que el mutante p.D1690N se queda

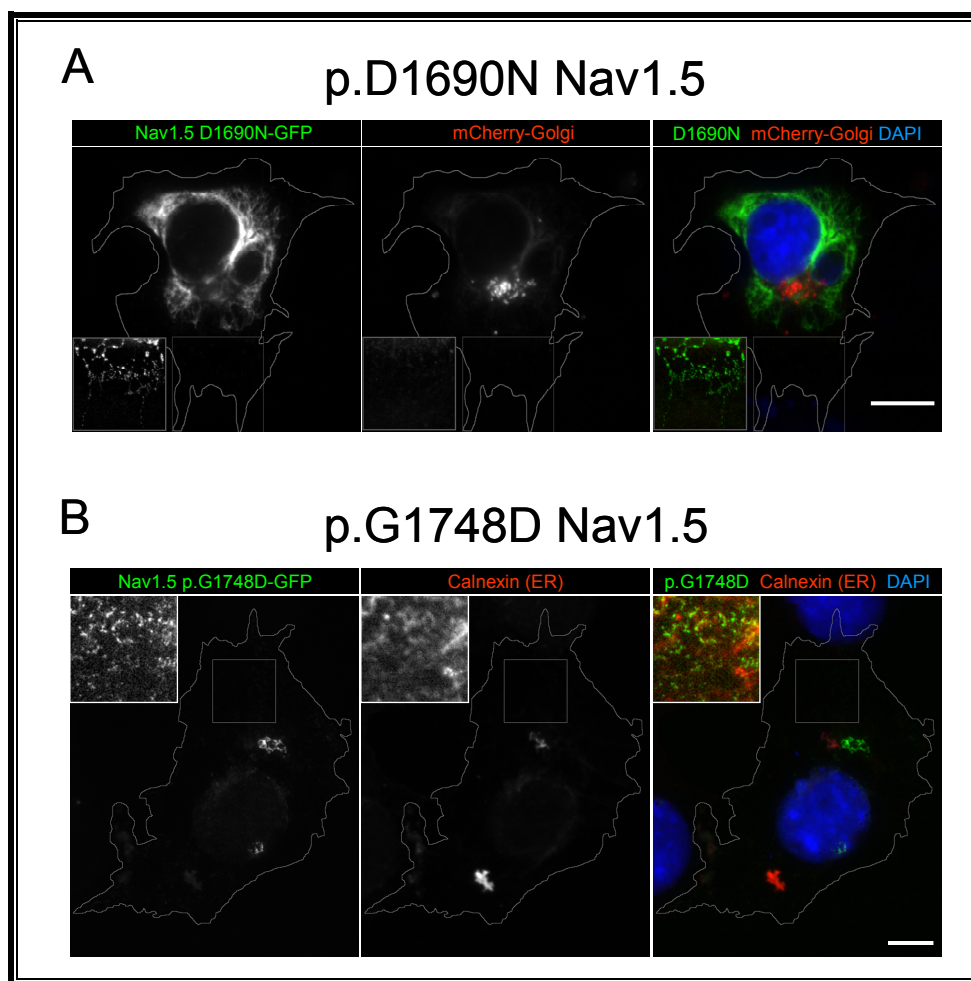


retenido en el RE (Figura 19). Además en algunas células se observaron unos acúmulos del canal presentes en el RE, quizá debido al estrés provocado en el mismo (Figura 19B).



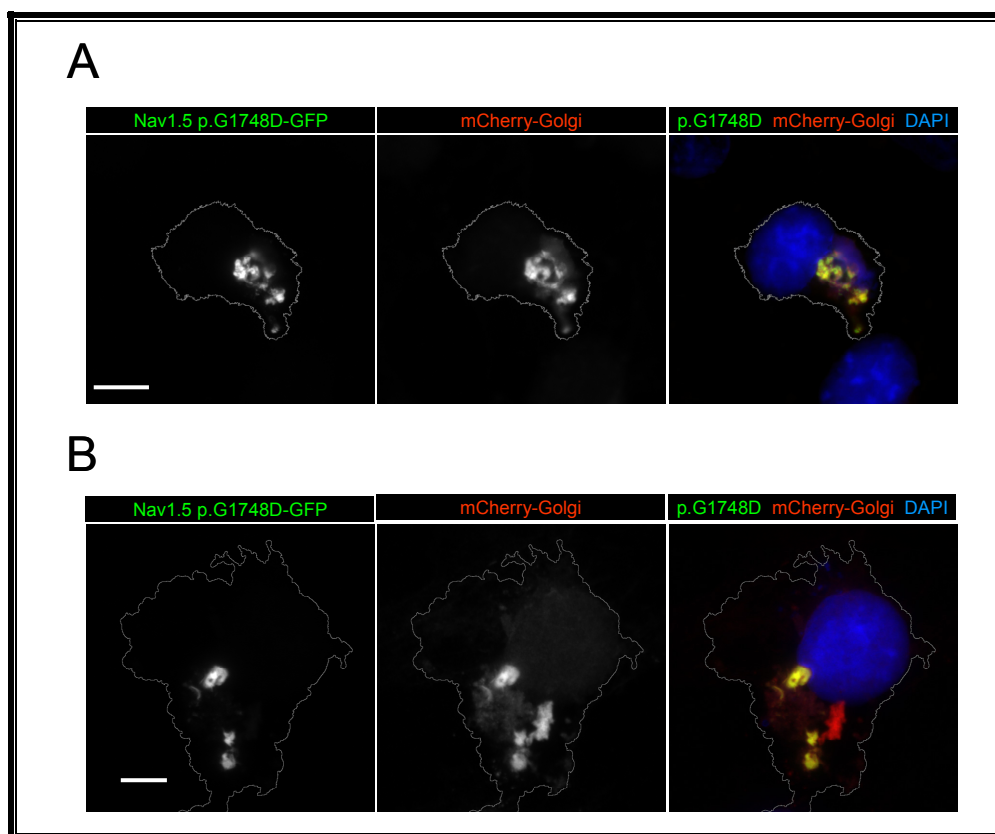
**Figura IV.19. Análisis inmunocitoquímico y colocalización del mutante p.D1690N-GFP (verde) y la Calnexina como marcador del RE (rojo) en células COS-7.** En el panel (A) se observa una célula con una distribución característica del RE, mientras que en el panel (B), el mutante forma acúmulos en el RE. Los núcleos se tiñeron con DAPI. El recuadro corresponde a la zona ampliada de la célula. Escala 25  $\mu$ m

Correspondiente con estos resultados, el mutante p.D1690N no colocalizó con marcadores de Golgi (Figura 20A).



**Figura IV.20.** Análisis inmunocitoquímico inverso y no-colocalización (A) del mutante p.D1690N-GFP (verde) y el mCherry-Golgi (rojo) y (B) del mutante G.1748D-GFP (verde) y la Calnexina como marcador del RE en células COS-7. Los núcleos se tiñeron con DAPI. El recuadro corresponde a la zona ampliada de la célula. Escala 25  $\mu$ m

Por otro lado, la expresión transitoria del mutante p.G1748D resultó en su acumulación en conglomerados intracelulares que colocalizan con el marcador del Golgi mCherry-Golgi (Figura 21), sugiriendo que estos canales residen en el aparato de Golgi posiblemente para ser degradados directamente allí. A su vez, el mutante p.G1748D no colocalizaba con el marcador del RE utilizado (Figura 20B). Sin embargo, los resultados obtenidos con diferentes marcadores del RE sugieren que el mutante p.G1748D produce un estrés evidente en el RE en vista de la distribución inusual del RE observada con todos los marcadores del RE incluido la Calnexina (Figura 20B).



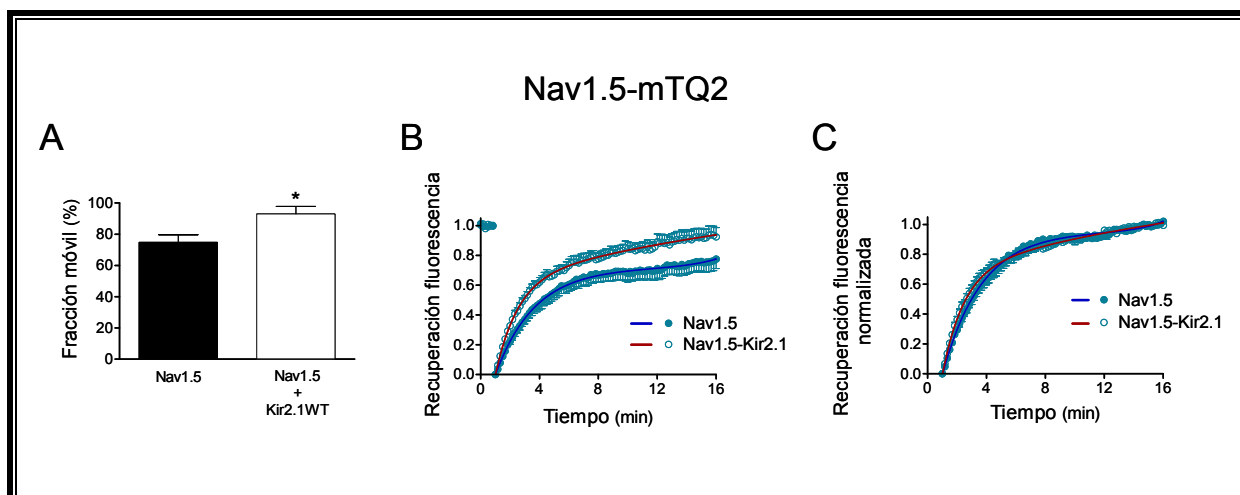
**Figura IV.21. Análisis inmunocitoquímico y colocalización del mutante p.G1748D-GFP (verde) y el mCherry-Golgi (rojo) en células COS-7.** En ambas células -panel (A) y (B)-, se observa un patrón característico del aparato de Golgi. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Escala 25  $\mu$ m

En resumen, estos resultados sugieren que los canales p.D1690N se retienen mayoritariamente en el RE, mientras que los canales p.G1748D, y probablemente los canales p.D1816VfsX7, quedan retenidos en el aparato de Golgi. Además, apoyan la hipótesis de que los mutantes del canal Nav1.5 con defecto de tráfico retenidos en Golgi son los que producen EDN sobre canales Kir2.1.

### 3.2. ¿Cómo alcanzan la membrana los canales Nav1.5 y Kir2.1?

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que los canales Nav1.5 y Kir2.1 viajan de forma conjunta hacia la membrana, lo que explicaría porqué cuando uno de ellos queda atrapado en el aparato de Golgi el otro quede atrapado también. Para comprobar esta hipótesis, analizamos el tráfico de canales Nav1.5 y Kir2.1 por separado y conjuntamente. Mediante microscopia confocal se midió la recuperación de la fluorescencia tras la extinción (FRAP) de la fluorescencia emitida por dos fluoróforos, el mTq2 y el Cp173venus, que fueron unidos mediante subclonaje a los canales Nav1.5 (Nav1.5-mTq2) y Kir2.1 (Kir2.1-

Cp173venus), respectivamente (ver Métodos). Para ello, se transfectaron células COS-7 con canales Nav1.5-mTq2 y Kir2.1-Cp173venus, por separado o juntos, a las que se extinguía de forma irreversible la fluorescencia emitida por los fluoróforos unidos a los canales en una región (ROI) de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. La ROI era seleccionada considerando que no implicara ni la membrana citoplasmática ni el núcleo celular. La extinción de la fluorescencia de los fluoróforos mTq2 y Venus se realizaba mediante luz láser de una longitud de onda de 445 nm y 514 nm, respectivamente. Una vez extinguida la fluorescencia en la ROI se realizaban fotos seriadas cada 10 segundos durante 15 minutos para cuantificar como se recuperaba la fluorescencia en la ROI como consecuencia de la difusión citoplasmática de los canales Nav1.5-mTq2 y Kir2.1-Cp173venus juntos o por separado.



**Figura IV.22. Características de la recuperación de la fluorescencia de los canales Nav1.5mTq2.** (A) Porcentaje de fracción móvil en células COS-7 transfectadas con Nav1.5-mTq2 solos (0.5  $\mu\text{g}$ ) (barra negra) o junto a Kir2.1-Cp173venus (0.5  $\mu\text{g}$ ) (barra blanca). \*  $P < 0.05$  frente a Nav1.5-mTq2. (B) y (C) Curso temporal de la recuperación de la fluorescencia de Nav1.5-mTq2 solo (ajuste monoexponencial línea azul) o junto Kir2.1-Cp173venus (ajuste monoexponencial línea roja) sin normalizar (B) o normalizada al valor de la recuperación máxima (C). Las barras/puntos representan la media  $\pm$  EEM de  $n \geq 10$ .

La Figura IV.22A muestra el porcentaje de recuperación de la fluorescencia en estado estable ó fracción móvil y la 22B y C, las cinéticas de la recuperación de la fluorescencia tras extinguir el fluoróforo mTq2 unido a Nav1.5 en células COS-7 cotransfectadas o no con canales Kir2.1-Cp173venus. Como puede observarse en la Figura IV.22A y Tabla IV.2, la recuperación de la fluorescencia alcanzaba aproximadamente un 75% en células transfectadas con los canales Nav1.5-mTq2. Es importante destacar que en presencia de Kir2.1-Cp173venus, aumentaba marcadamente la fracción móvil hasta el 93% ( $P < 0.05$ ). Dichos resultados sugieren que en presencia de canales Kir2.1, el tráfico de los canales Nav1.5-mTq2

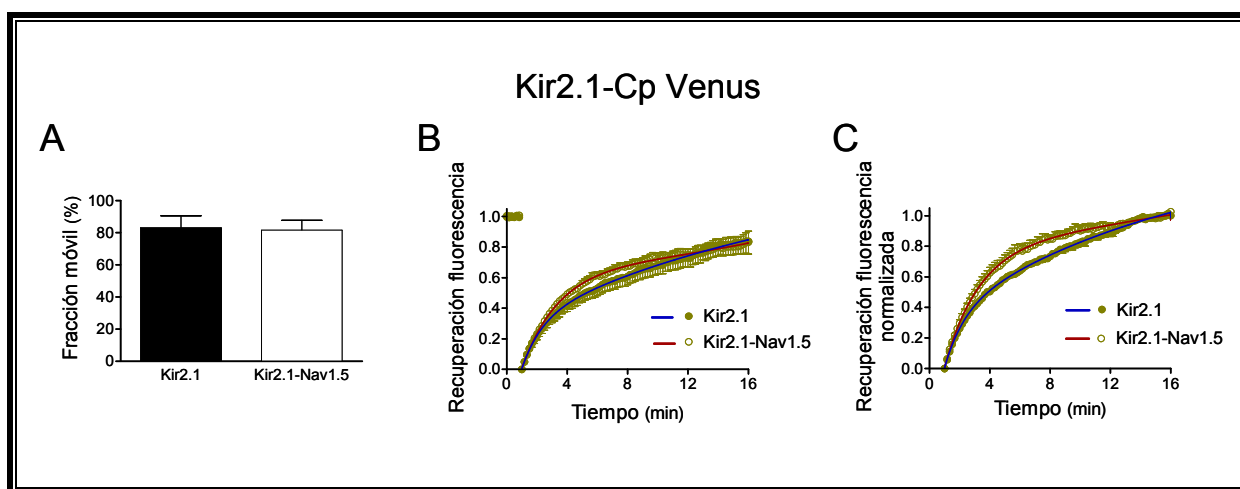
es más eficiente y por ello, la recuperación de la fluorescencia en estado estable es mayor. En ninguno de los casos en los 15 minutos de registro se alcanzaba el 100% de recuperación de fluorescencia. Al evaluar el curso temporal de la recuperación, pudimos comprobar que el canal Nav1.5-mTq2 presenta una constante de tiempo de recuperación al 50% ( $t_{1/2}$ ) de  $2.4 \pm 0.2$  minutos (Tabla IV.2). En presencia de los canales Kir2.1-Cp173venus (Figura IV.22B), se puede observar que a partir de los 2 minutos las dos curvas se separan como consecuencia del aumento de la recuperación de la fluorescencia que produce la presencia de los canales Kir2.1. Sin embargo, no se producían cambios en la cinética de la recuperación, tal y como demuestra el valor de  $t_{1/2}$  (Tabla IV.2). Para facilitar la comparación del curso temporal en ausencia y en presencia de canales Kir2.1-Cp173venus, se normalizaron los valores de recuperación de la fluorescencia al valor máximo de recuperación (Figura IV.22C). Esta representación nos permite confirmar que no existen cambios significativos en la cinética de la recuperación de los canales Nav1.5-mTq2 cuando se expresan solos o en presencia de Kir2.1-Cp173venus.

	<b>Fracción móvil (%)</b>	<b><math>t_{1/2}</math> (min)</b>
<b>Nav1.5 (n=11)</b>	74.9 $\pm$ 4.8	2.4 $\pm$ 0.2
<b>Nav1.5-Kir2.1 (n=10)</b>	<b>93.0<math>\pm</math>4.8*</b>	2.0 $\pm$ 0.2
<b>Kir2.1 (n=7)</b>	83.0 $\pm$ 7.5	4.7 $\pm$ 0.6
<b>Kir2.1-Nav1.5 (n=8)</b>	81.5 $\pm$ 6.3	<b>2.3<math>\pm</math>0.3**</b>

**Tabla IV.2. Valores del porcentaje de fracción móvil y el tiempo medio  $t_{1/2}$  de recuperación de la fluorescencia.** Las “n” representan el número de experimentos en cada grupo. \*  $P < 0.05$  frente a Nav1.5. \*\*  $P < 0.05$  frente a Kir2.1.

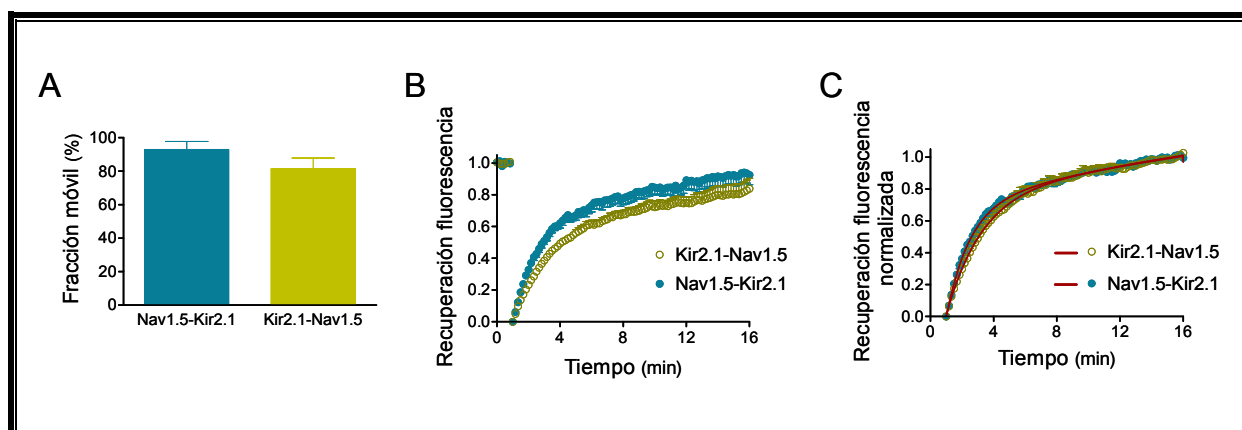
A continuación, analizamos la recuperación de la fluorescencia del fluoróforo Cp173venus unido a los canales Kir2.1, en presencia y ausencia de los canales Nav1.5-mTq2. En células transfectadas con los canales Kir2.1-Cp173venus, la fracción móvil alcanzaba un 83%, por tanto los canales Kir2.1 difunden más que los canales Nav1.5 lo que podría explicarse por el gran tamaño del canal Nav1.5 comparado con Kir2.1 (Figura IV.23A y Tabla IV.2). Sin embargo es de destacar que la cinética de la recuperación ( $t_{1/2} = 6.2 \pm 0.6$

minutos) es más de dos veces más lenta que la de los canales Nav1.5-mTq2. En presencia de los canales Nav1.5-mTq2, la fracción móvil no se veía modificada (Figura IV.23A y Tabla IV.2). Sin embargo, se observa una aceleración muy marcada de la cinética de recuperación (Figura IV.23B), tal y como demuestra la disminución en el valor de  $t_{1/2}$  (Tabla IV.2). Esta aceleración se aprecia mejor en la Figura IV.23C en la que se muestra la recuperación de fluorescencia normalizada a la recuperación máxima.



**Figura IV.23. Características de la recuperación de la fluorescencia Kir2.1-Cp173Venus.** (A) Porcentaje de fracción móvil en células COS-7 transfectadas con Kir2.1-Cp173Venus solo (0.5  $\mu$ g) (barra negra) o junto a Nav1.5-mTq2 (0.5  $\mu$ g) (barra blanca). (B) y (C) Curso temporal de la recuperación de la fluorescencia de Kir2.1-Cp 173Venus solo (ajuste biexponencial línea azul) o junto Nav1.5-mTq2 (ajuste biexponencial línea roja) sin normalizar (B) o normalizada a la recuperación máxima (C). Las barras/puntos representan la media $\pm$ EEM de  $n \geq 7$ .

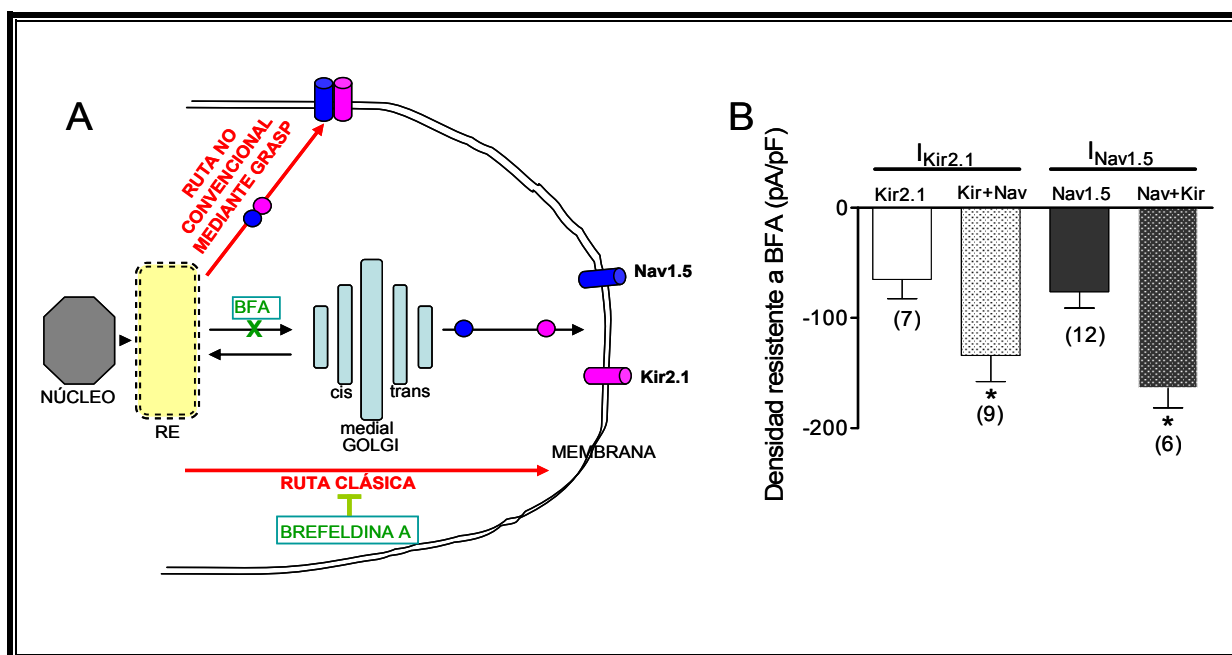
En la Figura IV.24 se ha representado la fracción móvil (panel A) y la cinética de la recuperación de la fluorescencia (Paneles B y C) de Nav1.5-mTq2 en presencia de canales Kir2.1, y la de Kir2.1-Cp173venus en presencia de canales Nav1.5. Como se puede observar, la fracción móvil y la cinética de la recuperación de la fluorescencia son prácticamente idénticas, lo que indica que se trata de los mismos complejos proteicos detectados mediante la recuperación de la fluorescencia de uno u otro fluoróforo. Todos estos resultados refuerzan la idea de que la coexpresión de ambos canales da lugar a complejos con una dinámica diferente a la de los canales por separado, ya que tienen mayor movilidad que la de los canales Nav1.5 y lo hacen más rápidamente que los canales Kir2.1. Estos resultados confirman que, en efecto, los canales Nav1.5 y Kir2.1 forman complejos que viajan de forma conjunta a la membrana.



**Figura IV.24. Características de la recuperación de la fluorescencia de los canales Nav1.5-mTq2 en presencia de Kir2.1-Cp173Venus y de los canales Kir2.1-Cp173Venus en presencia de Nav1.5-mTq2.** (A-C) Porcentaje de fracción móvil (A) y curso temporal de la recuperación de la fluorescencia sin normalizar (B) o normalizada a la recuperación máxima (C) medidas en células COS-7 transfectadas con canales Nav1.5-mTq2 en presencia de Kir2.1-Cp173Venus y de los canales Kir2.1-Cp173Venus en presencia de Nav1.5-mTq2. Las barras/puntos representan la media $\pm$ EEM de  $n \geq 8$ .

### 3.2.1. Inhibición del tráfico del RE a Golgi mediante incubación con BFA

La siguiente cuestión que nos planteamos es por qué mutantes del canal Nav1.5 retenidos en el Golgi producen EDN sobre canales Kir2.1 mientras que los mutantes retenidos en el RE, simplemente abolen la modulación positiva sin generar una disminución de corriente adicional. Como aproximación a continuación inhibimos en células CHO la ruta convencional de tráfico de proteínas de membrana de los canales Kir2.1 y Nav1.5 por separado o juntos, y tratados o no con brefeldina A (BFA) (50 ng/mL durante 24 h). El tratamiento con BFA (metabolito fúngico reversible) produce una acumulación de las proteínas en el RE y el colapso de los túbulos del Golgi ya que bloquea específicamente el tráfico anterógrado de proteínas de nueva síntesis desde el RE al Golgi (Figura IV.25A) (Lippincott-Schwartz y cols., 1989). Tras la incubación con BFA, la corriente  $I_{Kir2.1}$  generada tanto por canales Kir2.1 cotransfectados o no con canales Nav1.5 disminuyó un 49%; y la corriente  $I_{Nav1.5}$  generada tanto por canales Nav1.5 cotransfectados o no con canales Kir2.1 disminuyó un 65%.



**Figura IV.25. Inhibición del tráfico por la ruta clásica mediante incubación con BFA 24 horas.** (A) Modelo hipotético del tráfico de los canales Kir2.1, Nav1.5 y la población conjunta Nav1.5-Kir2.1 a través de la ruta clásica o la ruta no convencional. (B) Densidad de corriente máxima resistente a BFA registrada en células CHO transfectadas con canales Kir2.1, Nav1.5 o Kir2.1+Nav1.5 tras la incubación con BFA durante 24 horas. Cada barra representa la media±EEM de  $\geq 6$  células. Las (n) representan el número de células de cada grupo. \*  $P < 0.05$  frente a Kir2.1 solo o Nav1.5 solo.

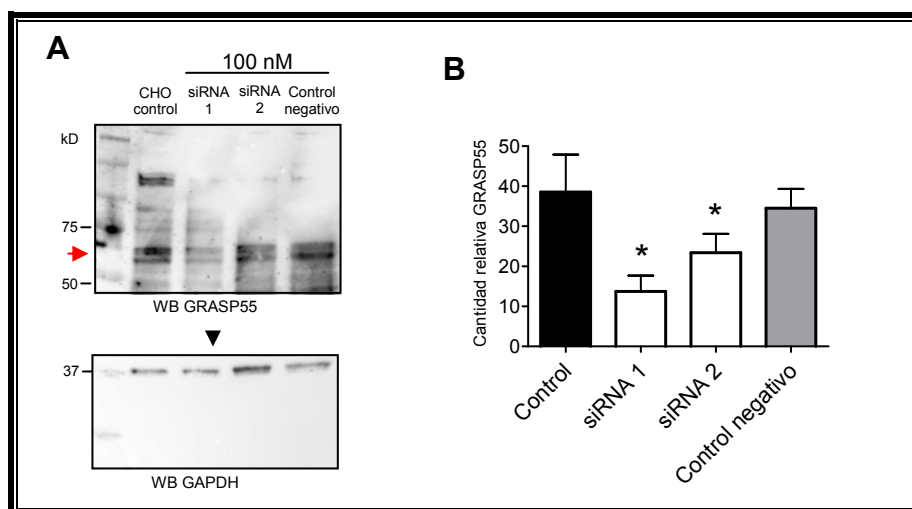
La Figura IV.25B muestra la densidad de la corriente resistente a BFA, es decir la densidad de  $I_{Kir2.1}$  y  $I_{Nav1.5}$  que se registra tras la incubación de 24 horas en presencia de BFA. Lo primero que se puede observar es que el tratamiento con BFA no anula ni la  $I_{Kir2.1}$  ni la  $I_{Nav1.5}$  lo que sugiere que existe una ruta alternativa de tráfico de canales Kir2.1 y Nav1.5 que no atraviesa el Golgi. Como se puede observar, la cotransfección con canales Nav1.5 produce un aumento significativo de la  $I_{Kir2.1}$  ( $n \geq 7$ ,  $P < 0.05$ ) resistente a BFA y, viceversa, la cotransfección con canales Kir2.1 produce un aumento significativo de la  $I_{Nav1.5}$  ( $n \geq 6$ ,  $P < 0.05$ ) resistente a BFA. Estos resultados sugieren que la inhibición del tráfico convencional mediante el tratamiento con BFA no afecta a la modulación recíproca positiva entre canales Kir2.1 y canales Nav1.5.

Ya que la BFA bloquea la ruta clásica de tráfico de proteínas a membrana sin interferir en rutas de tráfico alternativas (Figura IV.25A) (Lippincott-Schwartz y cols., 1989), la corriente resistente a BFA representaría la corriente generada por aquellos canales que ya estaban en la membrana y que no se han degradado aún, canales reciclados y/o bien canales que lleguen a la membrana a través de una ruta no convencional independiente del Golgi.



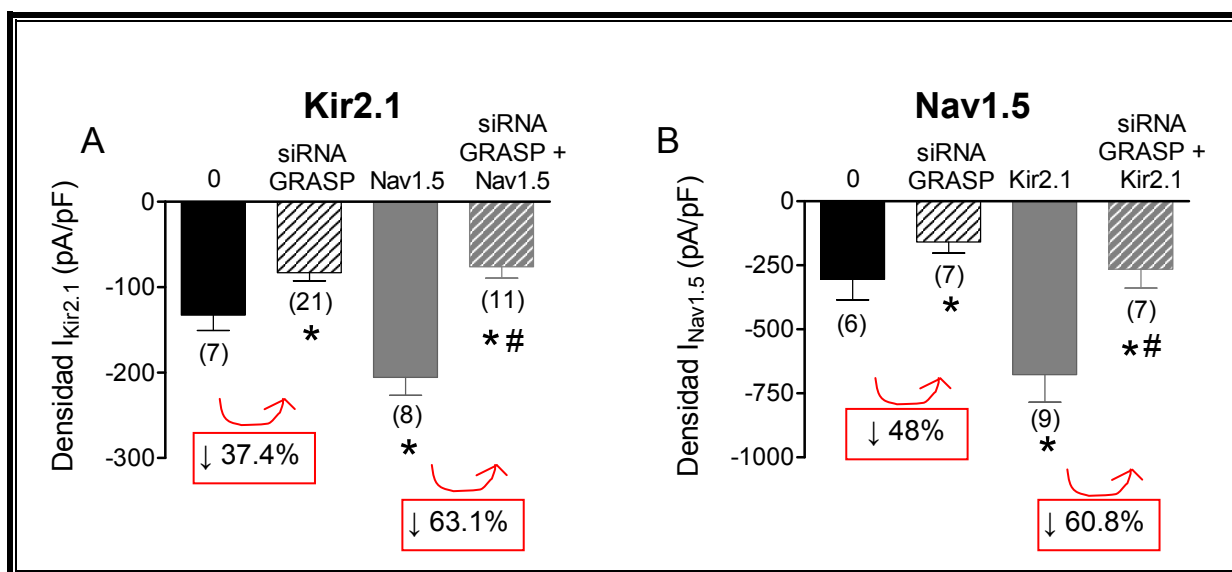
### 3.2.2. Tráfico no convencional de los canales Kir2.1-Nav1.5 mediado por GRASP55

Se ha descrito que los canales CFTR activados por AMPc pueden llegar a membrana en casos de estrés celular a través de un mecanismo de tráfico no convencional mediado por proteínas asociadas al Golgi (*Golgi reassembly stacking proteins* o GRASPs) (Gee y cols., 2011). De hecho, los canales Nav1.5 pueden traficar a membrana tanto por la vía clásica como por una vía alternativa independiente del Golgi (Mercier y cols., 2015) que podría ser dependiente de GRASP55. De la proteína GRASP, que tiene dos dominios PDZ, existen diversas isoformas, pero en las células CHO solo está presente una (GRASP55). Para analizar el posible papel de GRASP55 en la modulación positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.1, redujimos su expresión en células CHO utilizando ARN interferente (siRNAs). Los siRNAs son secuencias cortas que se unen al ARNm y evitan que la proteína se traduzca. La parte superior de la Figura IV.26A muestra un gel de proteínas en el que se muestra la expresión de la proteína GRASP55 (marcada con una flecha roja) con un peso de 55 kDa tanto en situación control como en presencia de los distintos siRNAs (siRNA 1 y siRNA 2, con secuencias específicas para GRASP55, y el control negativo inespecífico). En la parte inferior de la Figura IV.26A se muestra el mismo gel de proteínas con la proteína GAPDH (a 37 kDa) como control de carga. El análisis cuantitativo de los geles demostró que la transfección con el siRNA 1 (100 nM tras 48 horas) redujo la expresión de GRASP55 casi un 70% de manera específica la expresión de GRASP55 en células CHO, mientras que el control negativo (un siRNA que codifica para una secuencia aleatoria) no afectó significativamente su expresión. El siRNA 2 también redujo de manera significativa la expresión de GRASP55 pero menos que el siRNA1, por lo que se seleccionó éste último.



**Figura IV.26. Silenciamiento de la proteína GRASP55 mediante siRNAs.** (A) Western blot para detectar GRASP55 en células CHO sin transfectar o transfectadas con dos siRNAs específicos para GRASP55 o con el siRNA control negativo. La flecha roja indica la presencia de la proteína GRASP55 (alrededor de 55 kDa). La proteína GAPDH se utilizó como control de carga. WB: Western blot revelado con anticuerpo anti GRASP55 o anti GAPDH. (B) Análisis densitométrico de la banda de GRASP55 obtenida por Western blot y normalizada a la cantidad de GAPDH. Cada barra representa la media±EEM de 4 experimentos. \* P < 0.05 frente a Control.

A continuación, se transfectaron los canales Kir2.1 y Nav1.5 por separado o conjuntamente en células CHO transfectadas con siRNA1 y se registró la  $I_{\text{Kir2.1}}$  y la  $I_{\text{Nav1.5}}$ . El silenciamiento de GRASP55 disminuyó significativamente la densidad de la  $I_{\text{Kir2.1}}$  ( $n=21$ ,  $P<0.05$ ) y la de la  $I_{\text{Nav1.5}}$  ( $n=7$ ,  $P<0.05$ ) en un 37% y en un 48%, respectivamente (Figuras IV.27A y 27B, respectivamente). Este resultado sugiere que la ruta de tráfico no convencional GRASP-dependiente participa en el tráfico de los dos tipos de canales (especialmente en el tráfico de Nav1.5). Lo que es más importante, la Figura IV.27A demuestra que en células CHO en las que se ha silenciado la expresión de GRASP, la cotransfección con canales Nav1.5 no modula positivamente la densidad de  $I_{\text{Kir2.1}}$ , si no que la reduce, en un porcentaje aún mayor que cuando están los canales Kir2.1 solos (63% disminución,  $n=11$ ,  $P<0.05$ ). De la misma manera, la cotransfección con canales Kir2.1 tampoco aumenta la densidad  $I_{\text{Nav1.5}}$  si no que la reduce en un 61% ( $n=7$ ,  $P<0.05$ ) (Figura IV.27B). Es decir, la inhibición de la ruta de tráfico no convencional GRASP-dependiente inhibe la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.1. En base a estos resultados podemos concluir que existe una población de canales Kir2.1-Nav1.5 que trafican juntos a través de una ruta no convencional, independiente del aparato de Golgi, mediada por GRASP55 (Figura IV.25A).



**Figura IV.27. Efecto del silenciamiento de GRASP55 en células CHO en las corrientes  $I_{Kir2.1}$  e  $I_{Nav1.5}$ .** (A) Densidad  $I_{Kir2.1}$  a  $-120$  mV registrada en células con GRASP silenciado o no transfectadas con canales Kir2.1 solo o Kir2.1+Nav1.5. (B) Densidad máxima  $I_{Nav1.5}$  registrada en células con GRASP silenciado o no transfectadas con canales Nav1.5 solo o Nav1.5+Kir2.1. Los recuadros rojos señalan el porcentaje de disminución en cada grupo. Cada barra representa la media $\pm$ EEM de (n) células. \*  $P < 0.05$  frente a Kir2.1 o Nav1.5 solos. #  $P < 0.05$  frente a Kir2.1+Nav1.5.

En conclusión, aquellos mutantes del canal Nav1.5 o Kir2.1/2.2 que se queden retenidos en el RE podrán ser rescatados por canales Kir2.1/2.2 o Nav1.5, respectivamente, a través de la ruta no convencional independiente del Golgi mediada por GRASP. Al contrario, mutantes que se retengan en el Golgi atraparán a los otros canales (ya que no tienen vía de escape) y producirán EDN, produciendo por tanto una disminución adicional de la corriente.

## **V. DISCUSIÓN**



En la Presente Tesis Doctoral hemos demostrado que mutantes del canal Nav1.5 que no alcanzan la membrana tras su síntesis no modulan positivamente la  $I_{K1}$ . Además, alguno de estos mutantes producen un EDN sobre canales Kir2.1/Kir2.2 y, por tanto, una disminución adicional de la  $I_{K1}$  tal y como hemos demostrado en sistemas de expresión heterólogos, miocitos ventriculares de rata y miocitos derivados de hiPSC. Más aún, los resultados sugieren que los mutantes retenidos en el aparato de Golgi son los que atrapan consigo a los canales Kir2.1/Kir2.2 produciendo el EDN. Describimos por primera vez que existe una población de canales Kir2.1-Nav1.5 que viajan juntos hacia la membrana, a través de una ruta no convencional, independiente del aparato de Golgi, mediada por la proteína GRASP. Esta ruta de tráfico de los canales desde el RE hacia la membrana es responsable de la modulación recíproca positiva siempre cuando ninguno de ellos quede retenido en el aparato de Golgi.

## **1. LOS CANALES Kir2.1 INTERACCIONAN CON LOS CANALES Nav1.5 FORMANDO UN CANALOSOMA**

En la presente Tesis Doctoral demostramos que existe una interacción física (directa o indirecta) entre los canales Nav1.5 y Kir2.1/Kir2.2 en la membrana lateral y en las estriaciones de los miocitos cardiacos. Los resultados demuestran también que en los canalosomas que reúnen a los canales Nav1.5 y Kir2.1 está presente la proteína de anclaje  $\alpha 1$ -sintrofina. Resultados previos demostraban que la  $\alpha 1$ -sintrofina se localiza preferentemente en la membrana lateral de los miocitos. De hecho, se ha descrito que existen al menos dos poblaciones de canales Nav1.5, una presente en la membrana lateral de los miocitos unida al complejo sintrofina-distrofina y otra unida a SAP97 en discos intercalares (Petitprez y cols., 2011). La polaridad en la distribución de los canales Nav1.5 en los miocitos cardiacos explica que en el miocardio la conducción del impulso sea anisótropa, es decir, que la velocidad de conducción transversal o longitudinal sea diferente, siendo hasta 6 veces más rápida en sentido longitudinal. Nuestros resultados demuestran que en las membranas laterales no sólo están distribuidos los canales Nav1.5 sino también los canales Kir2.1, lo que probablemente garantiza un exquisito control de la excitabilidad y la refractariedad cardíacas. Por otra parte, nuestros resultados con anticuerpos específicos anti- $\alpha 1$ -sintrofina demuestran también la presencia de los canales Nav1.5 en las estriaciones de la membrana. Las microfotografías sugieren que los canales Nav1.5 y Kir2.1 y la  $\alpha 1$ -sintrofina se acumulan en la región de los túbulos T. Sin embargo, experimentos de inmunofluorescencia (Shy y cols., 2014) y registros

en macro-parches mediante técnicas de super-resolución llevados a cabo en miocitos cardiacos sugieren que los canales Nav1.5 se localizan preferentemente en las crestas y no en los túbulos T (Bhargava y cols., 2013).

## 2. ESTUDIO DE LOS MUTANTES DEL CANAL Nav1.5

En esta Tesis Doctoral quisimos averiguar qué ocurría cuando se producía una disminución en la densidad y/o la función de los canales Nav1.5. Esta disminución puede ser consecuencia de un problema adquirido o genéticamente determinado, como es el caso de las canalopatías hereditarias debidas a mutaciones en el gen *SCN5A* que codifican canales Nav1.5 con una función y/o expresión deficitarias. La evidencia experimental de que, en los ratones considerados como un modelo aceptado de SBr, la delección de uno de los alelos del gen *SCN5A* no sólo disminuye la  $I_{Na}$  sino también la  $I_{K1}$  resultó decisiva. Los resultados confirmaban *in vivo* que un aumento o disminución ya sea de la  $I_{Na}$  o  $I_{K1}$  se acompaña por un cambio recíproco en las corrientes  $I_{K1}$  o  $I_{Na}$ , respectivamente. Sin embargo, podía ser que la ausencia de un alelo de *SCN5A* no diera lugar a los mismos efectos sobre la  $I_{K1}$  (y sobre la  $I_{Na}$ ) que la presencia de una proteína mutada Nav1.5.

### 2.1. Efectos sobre la modulación positiva

Los resultados demuestran que una condición imprescindible para que haya modulación positiva es el tráfico de los canales Nav1.5 y Kir2.1 a la membrana. De hecho los mutantes de Nav1.5 que no viajan bien a membrana (véase p.R104W, p.D1690N, p.G1748D y p.D1816VfsX7) no modulan positivamente la  $I_{Kir2.1}$ . Al contrario, el mutante p.R878C, que sí se expresa en membrana pero no genera corriente (Zhang y cols., 2008), sí es capaz de modular positivamente la  $I_{Kir2.1}$ . Los resultados sugieren que independientemente de la localización de la mutación (en el dominio N-terminal, la región transmembrana o el C-terminal) y de su naturaleza (mutaciones con cambio de sentido o desplazamiento del marco de lectura), si el canal Nav1.5 no se expresa en membrana, no modula positivamente la  $I_{Kir2.1}$ . De hecho, cuando se restauraba el tráfico del mutante p.D1690N con la presencia del polimorfismo p.H558R en *cis* (Núñez y cols., 2013), se restauraba también su capacidad para modular positivamente la  $I_{Kir2.1}$ .

Planteamos, por tanto, en primicia, que aquellos pacientes que tienen mutaciones que producen el déficit de función de los canales Nav1.5 porque la mutación impide la adecuada expresión de los canales Nav1.5 en la membrana, presentarán alteraciones eléctricas cardiacas no sólo debidas a una disminución de la  $I_{Na}$  sino también de la  $I_{K1}$  ventricular.

Más aún, algunos mutantes de Nav1.5 como el p.G1748D y el p.D1816VfsX7 no solo suprimen la modulación positiva sino que además producen EDN sobre los canales Kir2.1/Kir2.2 ya que los atrapan produciendo una disminución adicional de la corriente  $I_{Kir2.1}$ . Estos resultados se han demostrado en sistemas de expresión heterólogos, miocitos de rata y hiPSC-CM lo que hace poco probable que sean debidos a un artefacto experimental. Así, la expresión del mutante p.G1748D en miocitos derivados de hiPSC estimulados a 1 Hz produce la disminución de la velocidad de conducción y la velocidad máxima de despolarización ( $dV/dt$ ), la despolarización del potencial de reposo y una prolongación de la DPA medida al final de la repolarización, concordante con la disminución de la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$ . En miocitos derivados de hiPSC que expresaban el mutante p.G1748D no estimulados eléctricamente, la frecuencia espontánea de disparo aumentó significativamente, debido a que el potencial máximo diastólico se acerca al potencial umbral como consecuencia de la disminución de la  $I_{K1}$ .

## 2.2. EDN de los mutantes de Nav1.5 sobre los canales Kir2.1

El EDN implica que la proteína codificada por un alelo mutado actúa como una proteína “tóxica” afectando negativamente la actividad y/o expresión de la proteína WT codificada por el alelo sano. Implica, también, que ambas proteínas interaccionan entre sí una vez sintetizadas. El EDN entre canales Nav1.5 se ha observado con distintas mutaciones y fue la primera pista que levantó la sospecha que los canales Nav1.5 interaccionan entre sí a pesar de que cada subunidad *a per se* es capaz de generar un canal funcional (Núñez et al., 2013; Chen-Izu y cols., 2015; Sottas y cols., 2016). Datos previos de nuestro laboratorio demostraban que tanto p.D1690N como p.G1748D producen EDN sobre los canales Nav1.5 nativos reduciendo de forma muy marcada la densidad de la  $I_{Na}$  (Núñez et al., 2013). Por el contrario, p.D1816VfsX7 no produce EDN, probablemente porque la subunidad mutada no es capaz de interaccionar con los canales nativos, porque para ello es necesaria la presencia de los dominios PDZ intactos. Sorprendentemente, p.D1816VfsX7 pero no p.D1690N, produce EDN sobre los canales Kir2.1/2.2, lo que implica que los determinantes moleculares o



funcionales de la interacción Nav1.5/Kir2.1 son distintos a los de la interacción entre canales Nav1.5.

El hecho de que un mutante del canal de sodio sea capaz de atrapar a canales Kir2.1/Kir2.2 indica que interaccionan entre sí y que la interacción se produce antes de llegar a membrana, sugiriendo que el transporte se produce al menos parcialmente de forma conjunta. De hecho, los resultados que presentamos obtenidos al estudiar la recuperación de la fluorescencia tras su extinción (FRAP) así lo sugieren. Efectivamente, si no hubiera interacción, entre al menos una subpoblación de los canales Nav1.5 y Kir2.1 durante su tráfico a la membrana, no se explicaría porqué la presencia de canales Nav1.5 acelera la cinética de recuperación de la fluorescencia en un área de interés. De la misma manera, parece que la presencia de canales Kir2.1 aumenta la fracción de canales Nav1.5 que se mueve en el interior celular aunque este desplazamiento se realice a la misma velocidad. Los resultados de FRAP nos han permitido comprobar que la movilidad de los canales Nav1.5 es muy limitada, de hecho, muy inferior a la de los canales Kir2.1. Es probable que su gran tamaño (2016 aminoácidos) sea en parte responsable su poca eficiencia en el tráfico hacia la membrana tendiendo a quedar “atascados” (ya que hablamos en términos circulatorios) en depósitos intracelulares (Rook y cols., 2012). Sin embargo, puede ser que las razones sean otras, y que quizá las señales de “salida” desde los compartimentos intracelulares presentes en los canales Nav1.5 sean mal o poco reconocidas (en el caso de existir) o que las señales de “retención” en dichos compartimentos sean las que predominan. Desde este punto de vista es sugerente proponer que los canales Kir2.1 estarían actuando como “chaperonas”, al igual que las subunidades Nav $\beta$ , favoreciendo el desplazamiento de las proteínas Nav1.5 sintetizadas a sus dominios en la membrana.

Con respecto al EDN producido por algunos mutantes de Nav1.5 sobre los canales Kir2.1/2.2 cabe señalar que no es la primera vez que se describe que canales codificados por distintos genes interaccionan entre sí. Los canales hERG y KvLQT1, responsables de la  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  respectivamente, además de una interacción dependiente de voltaje, interaccionan de manera directa a través de su dominio C-terminal (Organ-Darling y cols., 2013). De hecho, se ha descrito una modulación negativa recíproca entre hERG y Kv7.1 en miocitos de conejos transgénicos con SQT1 en los cuales la expresión de canales Kv7.1 WT o mutantes reducía significativamente la  $I_{Kr}$  y *viceversa* (Ren y cols., 2010). También se ha propuesto que una relación entre la corriente generada por canales Kv4.2 y Kv4.3 ( $I_{to}$ ) y la  $I_{Na}$ . En un modelo canino, el aumento de la  $I_{to}$  disminuía la velocidad de conducción aunque en este caso no se

demostró la interacción entre canales Kv4.x y Nav1.5 (Hoogendijk y cols., 2010). Cabe la posibilidad, por tanto, de que en el canalosoma que forman los canales Kir2.1/Kir2.2 y Nav1.5 participen otros canales.

### 2.3. Retención de los mutantes del canal Nav1.5 en RE o Golgi

La pregunta que suscitaban los resultados obtenidos era cuál era la diferencia entre los canales p.D1690N y los p.G1748D y p.D1816VfsX7, que estos últimos produjesen EDN sobre los canales Kir2.1/2.2 mientras que p.D1690N no. Nuestros estudios funcionales sugieren que si bien los tres mutantes no son capaces de alcanzar la membrana plasmática unos quedan retenidos en el RE (p.D1690N) mientras que otros (p.G1748D y p.D1816VfsX7) quedan atrapados en el Golgi. Resultados de otros laboratorios con mutantes de canales Nav1.5 y, sobre todo, de canales Kv11.1 (hERG) demuestran que los mutantes que quedan atrapados en el RE pueden ser "rescatados" con diversas maniobras que incluyen la presencia de chaperonas químicas (p.ej. el fenilbutirato) o de la disminución de la temperatura de incubación (Zhou y cols., 1999; Rajamani y cols., 2002; Valdivia y cols., 2004; Dolz-Gaitón y cols., 2013). En el caso de los canales hERG, fármacos que los bloquean (terfenadina, E4031) o que no los bloquean pero a los que se unen con alta afinidad (fexofenadina) son capaces de "restaurar" el tráfico de los canales mutados a la membrana (Zhou y cols., 1999; Rajamani y cols., 2002). Se ha propuesto que la unión del fármaco a su receptor favorece el adecuado plegamiento de la proteína en el RE y/o permite que se superen los controles de calidad del RE. Resulta llamativo que existen mecanismos experimentales no siempre aplicables a la terapéutica (reducir la temperatura) que pueden paliar aunque sea parcialmente el tráfico de mutantes que quedan atrapados en el RE pero de momento no se ha descrito ninguno que pueda "rescatar" el transporte de mutantes que quedan retenidos en el Golgi.

Nuestros resultados sugieren que aquellos mutantes que quedan retenidos en el RE son los que simplemente suprimen la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.1 mientras que los que quedan atrapados en el Golgi son los que producen EDN recíproco (Figura V.1.).

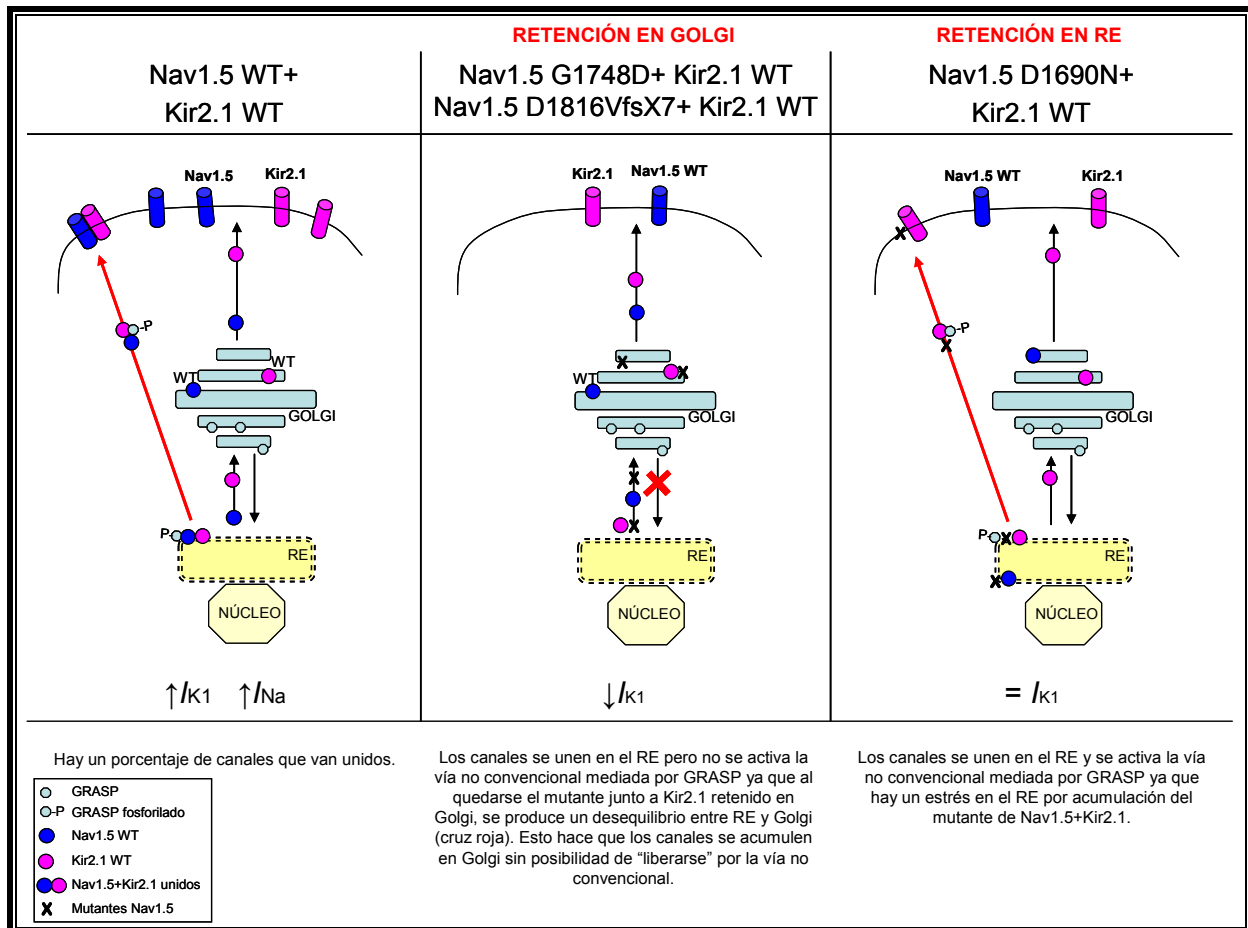
### 3. TRÁFICO NO CONVENCIONAL MEDIADO POR GRASP

GRASP65 y GRASP55 son dos proteínas miristoiladas de mamíferos que inicialmente se pensó que participaban exclusivamente en el apilamiento de las cisternas del Golgi (Shorter y cols., 1999). Sin embargo, los homólogos de GRASP en *D. discoideum* y en *D. melanogaster*, GrpA y dGRASP respectivamente, se han asociado al tráfico de ciertas proteínas a través de una vía independiente de Golgi (Kinseth y cols., 2007; Schotman y cols., 2008). Recientemente se ha ampliado esta función a las proteínas GRASP de mamíferos, y de hecho, se ha demostrado que están implicadas en el tráfico no convencional independiente de Golgi del canal CFTR (Gee y cols., 2011) no siendo necesarias para el tráfico de proteínas anterógrado convencional (Schotman y cols., 2008). En la presente Tesis Doctoral, podemos concluir que GRASP55 participa en condiciones normales en el transporte de canales Nav1.5 y Kir2.1 a la membrana, siendo responsable en mayor medida del transporte de Nav1.5 que el de canales Kir2.1. Más importante aún, hemos demostrado que, en aquellas células en las que se silenciaba la expresión de GRASP55, se suprimía también la modulación recíproca positiva. Por tanto, proponemos que cuando ambos canales están juntos, GRASP55 se encarga del transporte conjunto de canales Kir2.1-Nav1.5 a través de una ruta no convencional, independiente del aparato de Golgi, mediada por GRASP55.

Todos estos resultados nos han llevado a proponer un modelo en el que GRASP55 es capaz de ofrecer una ruta alternativa para el transporte de canales Nav1.5-Kir2.1 cuando alguno de los canales de la pareja presenta mutaciones que le impiden salvar adecuadamente los controles de calidad que garantizan la salida desde el RE hacia el Golgi. Por el contrario, cuando el mutante de alguno de los canales, sea Nav1.5 o Kir2.1, queda atrapado en el Golgi, GRASP55 ya no puede participar en el tráfico de la pareja de canales a través de la ruta convencional y ambos quedan retenidos en el Golgi, por lo que el mutado ejerce un EDN sobre el otro canal (Figura V.1).

Una cuestión de interés es cómo y por qué se activa la ruta no convencional mediada por GRASP. Se ha demostrado que el tráfico no convencional independiente de Golgi de canales CFTR se activa cuando se producen señales de estrés en el RE (Gee y cols., 2011). En el RE, las proteínas se pliegan y sufren algunas modificaciones importantes para su actividad y estructura que luego se completan/maduran en el Golgi (Schröder y Kaufman, 2005). El paso del RE al aparato de Golgi es un paso limitante en la secreción de muchas glicoproteínas (Schröder y Kaufman, 2005). Alteraciones en el RE debido a un exceso de proteínas nacientes

o mal plegadas activan la cascada de señales de respuesta a proteínas no plegadas [*unfolded protein response* (UPR)] (Wiseman y cols., 2010). En general, la UPR aumenta la capacidad de plegamiento del RE al promover la síntesis de chaperonas y aumentando el tamaño del RE (Ron y Walter, 2007; Schröder y Kaufman, 2005).



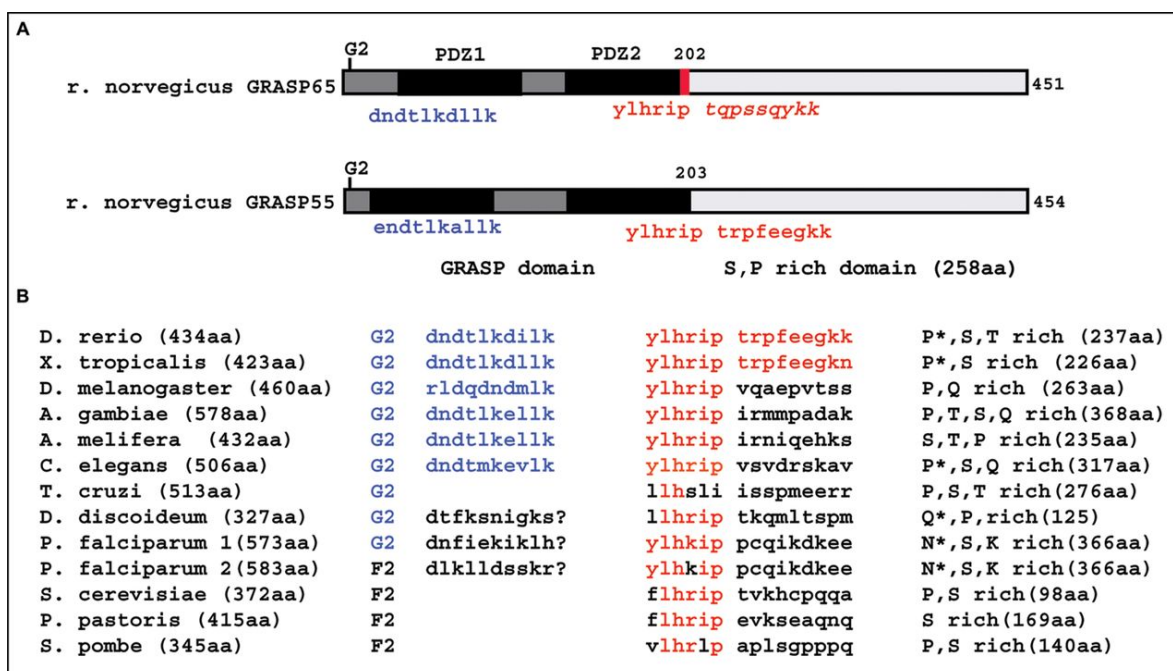
**Figura V.1. Propuesta de modelo de tráfico de canales Kir2.1+Nav1.5 en condiciones normales (WT) o con los distintos mutantes del canal Nav1.5.** En condiciones WT, hay una población de canales Nav1.5 y Kir2.1 que trafican por separado a través de una ruta clásica (del RE a Golgi a membrana). Adicionalmente, existiría una población de canales Nav1.5+Kir2.1 que trafican juntos a través de la ruta no convencional mediada por GRASP independiente del Golgi. Para ello, GRASP es transportado del Golgi al RE, se fosforila y se une a los canales. La disminución en la corriente  $I_{Na}$  se observa cuando las subunidades  $\alpha$  de los canales Nav1.5 WT y Nav1.5 mutante interaccionan y el canal WT se queda retenido con el mutante. Por otro lado, los canales Kir2.1 y Nav1.5 se unen en el RE. Cuando los mutantes son retenidos en el RE (p.D1690N), se observa parcialmente modulación positiva sobre  $I_{K1}$  ya que la acumulación del mutante unido a Kir2.1 en el RE produce un estrés sobre el mismo que activa la vía no convencional mediada por GRASP. Aunque esta vía no debe ser suficiente para ver un claro aumento de la corriente  $I_{K1}$ . Sin embargo, los mutantes que se quedan retenidos en el Golgi no son capaces de ser "liberados" y retienen a los canales Kir2.1 WT. Hay un balance de tráfico de proteínas entre el RE y el Golgi. En el caso de los mutantes retenidos en Golgi, se produce un desequilibrio (cruz roja) por la acumulación de canales en Golgi. Este modelo sería válido también para canales Kir2.2 pero no para canales Kir2.3. Para simplificar, no se ha representado ni la subunidad  $\beta$  ni otras proteínas del canalosoma Kir2.1-Nav1.5.

Es posible que la acumulación de canales Kir2.1 unidos a canales Nav1.5 en el RE provoque estrés en el mismo y active el tráfico no convencional dependiente de GRASP e independiente de Golgi para “liberar” la carga de proteínas acumuladas (Figura V.1). Más aún, nuestros datos funcionales sugieren que los mutantes p.D1690N se quedan retenido en el RE lo cual podría justificar que activasen el tráfico dependiente de GRASP55 tanto en presencia como en ausencia de Kir2.1.

No tenemos datos experimentales que demuestran cuáles son los determinantes moleculares de la interacción entre los canales y GRASP. Puede ocurrir, que se produzca través del dominio PDZ al igual que ocurre con el canal CFTR. La proteína GRASP tiene dos dominios PDZ en el N-terminal (Figura V.2). El tráfico independiente de Golgi requiere que GRASP se fosforile en una región cercana a su C-terminal, se disocien los complejos homomultiméricos de GRASP, se transloque al RE y se una a las proteínas diana vía el dominio PDZ (Gee y cols., 2011; Kim y cols., 2016). Además ya que GRASP55 es capaz de multimerizar, habría más dominios PDZ “disponibles” para la unión tanto de canales Kir2.1 como Nav1.5.

En el caso de que la interacción de Nav1.5-Kir2.1 con GRASP se produzca a través de los dominios PDZ, la unión sería específica. Por tanto, habría una especificidad en la carga que puede transportar GRASP, de manera que no todas las proteínas retenidas en el RE o no cualquier estrés del RE va a “liberarse” mediante la vía no convencional mediada por GRASP.

Sería interesante analizar a cuál de los dominios PDZ de GRASP55 se une cada canal. Asumiendo que la interacción del canal se produzca a través de sus dominios lineales C-terminales, cabría esperar que el canal Nav1.5 p.D1816VfsX7 no pudiese unirse a GRASP55 ya que a este mutante le faltan aminoácidos del dominio C-terminal incluyendo el dominio de unión a PDZ del C-terminal. Sin embargo, como describimos recientemente en nuestro laboratorio (Matamoros y cols., 2016), el canal Nav1.5 contiene un PDZ en el N-terminal que es crítico para la modulación positiva. Cabe la posibilidad, por tanto, de que sea este dominio de unión “interno” a PDZ el que permita la unión de Nav1.5 a GRASP55.



**Figura V.2. Dominios funcionales de los homólogos y ortólogos de GRASP.** (A) Representación esquemática de las proteínas GRASP65 (AF015264) y GRASP55 (AF110267) de rata. El fragmento N-terminal tiene dos dominios PDZ, con el dominio de trans-oligomerización (en azul) alojado en el PDZ1. El dominio de unión a GM130 se ha representado con las letras rojas en itálica. El fragmento C-terminal es rico en serinas y prolinas. (B) Comparación entre especies del número de aminoácidos de GRASP, la Gly conservada o no, el dominio de trans-oligomerización y de unión a GM130, los aminoácidos enriquecidos en el C-terminal, y entre paréntesis el tamaño de la proteína en *D. rerio* (NP\_956997 NCBI); *Xenopus tropicalis* (AAH74543 NCBI); *D. melanogaster* (AAF49092 NCBI); *A. gambiae* (PP\_308450 NCBI); *A. melifera* (PP\_393076 NCBI); *C. elegans* (NP\_501354 NCBI); *T. cruzi* (EAN99074 NCBI); *D. discoideum* (EAL60823 NCBI); *P. falciparum* GRASP1 (XP\_002585405 NCBI) y GRASP2 (XP\_001347453 NCBI); *S. cerevisiae* (NP\_01805 NCBI); *P. pastoris* (de Integrated Genomics) y *S. pombe* (NP\_593015 NCBI). \* representa el aminoácido enriquecido 4 veces o más. [Adaptado de Vinke y cols., 2011].

### 3.1. Direccionalidad

Otra cuestión importante que nos planteamos es si el tráfico no convencional es capaz de tener direccionalidad y clasificar y transportar las proteínas a su localización exacta (*sorting*). Debido a que las células CHO no son polares no pudimos distinguir si GRASP es capaz de hacer diferenciación de dominios. Sin embargo, estudios anteriores han demostrado que dGRASP media el transporte (independiente del Golgi) de la subunidad  $\alpha$  de la integrina a un área concreta de la membrana basolateral en algunos estados concretos del desarrollo de *Drosophila* (Schotman y cols., 2008). También se ha visto que GRASP transporta a un mutante del canal CFTR ( $\Delta F508$ ) a membrana apical en células de la cripta de Lieberkühn en ratones (Gee y cols., 2011). Esto es de particular interés ya que, como hemos mencionado, los miocitos cardíacos sí son células polarizadas y las poblaciones de canales Nav1.5 se unen a diferentes proteínas en función de su localización.

### 3.2. Patrón de glicosilación

Si bien las proteínas sufren algunas modificaciones postraduccionales en el RE, la mayor parte del proceso de maduración y glicosilación tiene lugar en el Golgi. Por tanto cabe esperar que la población de canales Nav1.5 que trafica junto a Kir2.1 a través de una ruta no convencional independiente de Golgi sean canales “inmaduros” parcialmente glicosilados. Se ha demostrado que los canales Nav1.5 inmaduros que sólo tengan N-glicosilaciones tempranas del RE pueden alcanzar la membrana (Mercier y cols., 2015). Sin embargo, se consideraba que para que los canales fuesen funcionales es indispensable que sufran un remodelado extenso de los N-glicanos y/o maduraciones postraduccionales adicionales en el Golgi (Mercier y cols., 2015). Es importante destacar que el canal Nav1.5 está mucho menos glicosilado (un peso alrededor de 15 kDa) que las isoformas neuronales que alcanzan pesos de 50-60 kDa. En ese sentido Nav1.5 es una excepción en la familia Nav ya que sólo un 5% de su masa se atribuye a oligosacáridos (Cohen y Levitt, 1993). Arakel y colaboradores demostraron que el patrón de glicosilación del canal Nav1.5 es cámara-específico puesto que es diferente en el tejido auricular que en el ventricular (Arakel y cols., 2014), estando más glicosilado en las aurículas que en los ventrículos. Aunque sea una mera especulación, cabe destacar la coincidencia de que los canales Nav1.5 ventriculares, que son los que se unen a Kir2.1, sean transportados por la vía no convencional independiente de Golgi, al menos parcialmente, y estén menos glicosilados.

## 4. IMPLICACIONES CLÍNICAS

Nuestros resultados confirman de nuevo que entre los canales Nav1.5 y Kir2.3 no se produce modulación recíproca positiva. De hecho, la presencia de subunidades Kir2.3 en los heterotetrámeros de Kir2.x suprime la modulación recíproca positiva con canales Nav1.5 (Matamoros y cols., 2016). Los canales Kir2.3 están presentes en el tejido auricular humano pero no en el ventricular (Gaborit y cols., 2007), por lo que propusimos que la modulación recíproca positiva entre  $I_{K1}$  e  $I_{Na}$  sólo tendrá lugar a nivel ventricular. De hecho, nuestros resultados han demostrado que el aumento de la  $I_{K1}$  producido por el remodelado eléctrico asociado a la FA en miocitos auriculares de pacientes no se acompaña de un aumento de la  $I_{Na}$  (Matamoros y cols., 2016). En los ratones genéticamente modificados no pudimos comprobar si la modulación se limitaba al tejido ventricular porque en esta especie no se expresan

canales Kir2.3 en las aurículas (Panama y cols., 2007). En la presente Tesis Doctoral hemos demostrado que la coexpresión de mutantes de Nav1.5 con Kir2.3 no modifica en absoluto la  $I_{Kir2.3}$ . Por tanto, nuestra hipótesis es que los cambios en la densidad de la  $I_{K1}$  asociados a mutaciones en los canales Nav1.5 sólo se manifestarán en el tejido ventricular de los pacientes portadores de las mismas.

La interacción entre la disponibilidad de canales de sodio y el componente de salida de la  $I_{K1}$  determina la velocidad de conducción, la excitabilidad y la DPA cardiacos (Lopatin y cols., 2001; Noujaim y cols., 2007b). De hecho la interacción molecular entre canales Kir2.1 y Nav1.5 determina en gran parte la frecuencia y estabilidad de los rotores (Milstein y cols., 2012). En estudios de mapeo óptico en monocapas de miocitos ventriculares de rata neonatales, la sobreexpresión de Nav1.5 facilita un aumento de la  $I_{K1}$  (Milstein y cols., 2012). El aumento de la  $I_{K1}$  hiperpolariza el potencial de membrana de reposo y contribuye tanto al acortamiento de la DPA, como a la aceleración de los rotores, ya que aumenta el número de canales de sodio disponibles al disminuir el porcentaje de canales que se encuentra en estado inactivo (Dhammon y Jalife, 2005).

Se puede especular que en aquellos pacientes portadores de mutaciones del canal Nav1.5 que dan lugar a su atrapamiento en el Golgi se producirá una disminución más marcada de la velocidad de conducción y la excitabilidad cardíacas que en los que la mutación se queda retenida en el RE. Hay que recordar que en los primeros será evidente una intensa disminución de la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  mientras que en los segundos la disminución será previsiblemente menor. Cabe recordar, por ejemplo que los canales Kir2.1/2.2 podrán rescatar parcialmente el tráfico de canales Nav1.5 atrapados en el RE lo que mitigará la reducción de la  $I_{Na}$ . Es importante recordar que en los síndromes arritmogénicos primarios consecuencia del déficit de función de los canales Nav1.5 existe una marcada variabilidad en la intensidad del fenotipo. De tal manera que mutaciones que producen una reducción similar en la densidad de la  $I_{Na}$  dan lugar a fenotipos más o menos marcados. Es posible que el "secuestro" o no de los canales Kir2.1 conjuntamente con los canales Nav1.5 en el Golgi contribuya a la variabilidad observada. Por último mencionar que hay síndromes arritmogénicos primarios debidos a la disminución de la  $I_{Na}$  que se producen como consecuencia de mutaciones en las subunidades accesorias Nav $\beta$  (Watanabe y cols., 2008). Sería interesante analizar cómo se afecta la densidad de la  $I_{K1}$  en este caso. De todos modos, mencionar que en todos nuestros experimentos se cotransfectaba la subunidad Nav $\beta$ 1.



Cabe destacar que el SAT es un síndrome arritmogénico primario debido a mutaciones en el gen *KCNJ2* que ocasionan pérdida de función de canales Kir2.1 (Tristani-Firouzi y cols., 2002; Tristani-Firouzi y Etheridge, 2010). La prevalencia del SAT es considerablemente inferior a la de por ejemplo el SBr. Lo que sugieren nuestros experimentos con mutantes de Kir2.1 es que las arritmias ventriculares asociadas al SAT serán consecuencia de una disminución conjunta del número de canales Kir2.1 y Nav1.5. Las mutaciones que producen EDN podrían “atrapar” además canales Nav1.5.

Más aún, hay enfermedades cardiovasculares altamente prevalentes como la ICC que se acompaña de una disminución significativa de la expresión de canales Kir2.1 y, como consecuencia, de la  $I_{K1}$  (Beuckelmann y cols., 1993). La disminución de la  $I_{K1}$  prolonga la duración de los potenciales de acción ventriculares y el intervalo QT del electrocardiograma, favoreciendo la aparición de taquicardias ventriculares polimórficas que pueden desencadenar en FV. De hecho, la principal causa de muerte en los pacientes con ICC es la FV. Nuestra hipótesis es que en los pacientes con ICC la disminución de canales Kir2.1 ventriculares, sí se acompañará de una disminución en la expresión de canales Nav1.5 y *viceversa*. Por tanto, en estos pacientes la disminución de la excitabilidad cardiaca se deberá a un doble mecanismo: disminución de la expresión de canales Kir2.1 y de canales Nav1.5.

Sorprende que evolutivamente se haya preservado la interacción entre la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  a nivel ventricular y no auricular. Es posible que alteraciones en la modulación recíproca positiva entre canales Nav1.5 y Kir2.x predispongan a la aparición de arritmias fibrilatorias en el contexto de la ICC, el SBr y el SAT. Más aún, nuestra hipótesis es que la composición del canalosoma de Nav1.5 y Kir2.1 a nivel ventricular protege frente a los desequilibrios entre  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$  y que la ausencia de este canalosoma común a nivel auricular favorece la frecuente aparición de FA.

Por otro lado, se abre el abanico de posibles interacciones entre canales con dominios de unión a PDZ. De tal manera, sería interesante analizar la posible modulación recíproca entre canales Kir2.1 neuronales y canales de sodio neuronales (de los cuales Nav1.2, Nav1.4, Nav1.6, y Nav1.7 tienen dominios de unión a PDZ descritos). Las implicaciones clínicas en este ámbito serían también enormes.

## **VI. CONCLUSIONES**



De los resultados presentados en esta **TESIS DOCTORAL** que fueron obtenidos en ratones genéticamente modificados, en líneas celulares inmortales transfectadas, en miocitos cardiacos de rata, y cardiomiocitos derivados de células pluripotentes inducidas humanas se pueden extraer las siguientes **CONCLUSIONES**:

1. Los canales Kir2.1 y Nav1.5 interaccionan entre sí y con la proteína de anclaje  $\alpha$ 1-sintrofina, en la membrana lateral y en las estriaciones de los miocitos ventriculares cardiacos.
2. Tanto los canales Nav1.5 como los canales Kir2.1 viajan hacia la membrana a través de dos rutas simultáneamente: la convencional, que implica el paso a través del RE, al Golgi, y desde allí a la membrana; y la no convencional, que es independiente de Golgi y está mediada por las proteínas GRASP.
3. En condiciones fisiológicas, la presencia simultánea de canales Nav1.5 y Kir2.1 en los miocitos cardiacos favorece la salida conjunta de ambos canales desde el RE a través de la ruta no convencional GRASP-dependiente.
4. Para que se produzca la modulación recíproca positiva entre los canales Nav1.5 y Kir2.1/2.2, y por tanto, entre la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$  ventriculares, es condición *sine qua non* que tanto los canales Nav1.5 como los canales Kir2.1/2.2 sean capaces de alcanzar la membrana y viajen conjuntamente.
5. Cualquier mutación en los canales Nav1.5 que limite el tráfico de los mismos hacia la membrana, independientemente de su localización y naturaleza, impedirá que los canales Nav1.5 modulen positivamente la  $I_{K1}$  ventricular, por lo que la densidad de ésta disminuirá.
6. Los canales Nav1.5 con mutaciones que impiden su salida desde el RE hacia el Golgi pueden ser parcialmente “rescatados” por los canales Kir2.1/2.2 con los que, probablemente, abandonan el RE siguiendo la ruta de tráfico no convencional, GRASP-dependiente. Este mecanismo no restituye completamente, pero mitiga, la disminución de la  $I_{Na}$  producida por este tipo de mutaciones.
7. Los mutantes del canal Nav1.5 que queden retenidos en el Golgi producen un efecto

dominante negativo sobre los canales Kir2.1/2.2 a los que atrapan también en el Golgi. Por tanto, los canales Nav1.5 con este tipo de mutaciones producen una disminución de la  $I_{K1}$  mayor que la producida por los mutantes Nav1.5 que quedan retenidos en el RE.

8. De todo lo anterior se puede concluir que en aquellos síndromes arritmogénicos primarios en los que las mutaciones en el gen *SCN5A* producen una disminución de la  $I_{Na}$  como consecuencia del incorrecto tráfico de los canales Nav1.5 a la membrana, la excitabilidad y la velocidad de conducción intracardiacas disminuirán por la inhibición concurrente de la  $I_{Na}$  y la  $I_{K1}$ .

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SAN. MiRP1 forms  $I_{Kr}$  potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;**97**:175-187.
- Abriel H, Kamynina E, Horisberger JD, Staub O. Regulation of the cardiac voltage-gated  $Na^+$  channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *FEBS Lett* 2000;**466**:377-380.
- Abriel H, Kass RS. Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Nav1.5 by interacting proteins. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;**15**:35-40.
- Abriel H, Sottas V. Unexpected  $\alpha$ - $\alpha$  interactions with Nav1.5 genetic variants in Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;**7**:97-9.
- Abriel H, Rougier JS, Jalife J. Ion channel macromolecular complexes in cardiomyocytes: roles in sudden cardiac death. *Circ Res*. 2015;**116**:1971-88.
- Ackerman MJ, Clapham DE. Ion channels - Basic science and clinical disease. *N Eng J Med* 1997;**336**:1575-1586.
- Ackerman MJ. Cardiac channelopathies: It's in the genes. *Nat Med* 2004;**10**:463-464.
- Agullo-Pascual E, Lin X, Leo-Macias A, Zhang M, Liang FX, Li Z, Pfenniger A, Lübke-meier I, Keegan S, Fenyö D, Willecke K, Rothenberg E, Delmar M. Super-resolution imaging reveals that loss of the C-terminus of connexin43 limits microtubule plus-end capture and Nav1.5 localization at the intercalated disc. *Cardiovasc Res*. 2014;**104**(2):371-81.
- Albesa M, Ogrodnik J, Rougier JS, Abriel H. Regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by utrophin in dystrophin-deficient mice. *Cardiovasc Res*. 2011;**89**:320-8.
- Albrecht DE, Froehner SC. Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. *Neurosignals*. 2002;**11**:123-9.
- Albsoul-younes AM, Sternweis PM, Zhao P, Nakata H, Nakajima S, Nakajima Y, Kozasa T. Interaction sites of the G protein  $\beta$  subunit with brain G protein-coupled inward rectifier  $K^+$  channel. *J Biol Chem* 2001;**276**:12712-12717.
- Aldrich RW, Corey DP, Stevens CF. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature* 1983;**306**:436-441.
- Aleksandrov A, Velimirovic B, Clapham DE. Inward rectification of the IRK1  $K^+$  channel reconstituted in lipid bilayers. *Biophys J* 1996;**70**:2680-2687.
- Allessie MA, Lammers WJEP, Bonke FIM, Hollen J. Experimental evaluation of Moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. En: *Cardiac electrophysiology and arrhythmias*. Zipes DP, Jalife J (Eds.) 1985; 265-276.
- Allouis M, Le Bouffant F, Wilders R, Pérez D, Schott JJ, Noireaud J, Le Marec H, Mérot J, Escande D, Baró I. 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circ Res*. 2006;**98**:1538-46.
- Almers W. Potassium conductance changes in skeletal muscle and the potassium concentration in the transverse tubules. *J Physiol* 1972;**225**:33-56.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;**431**:350-5.
- Amin AS, Meregalli PG, Bardai A, Wilde AA, Tan HL. Fever increases the risk for cardiac arrest in the Brugada syndrome. *Ann Intern Med*. 2008;**149**:216-8.
- Amin AS, Tan HL, Wilde AA. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm*. 2010;**7**:117-26.
- Amin AS, Pinto YM, Wilde AA. Long QT syndrome: beyond the causal mutation. *J Physiol*. 2013;**591**:4125-39.
- Amorós I, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Matamoros M, Barana A, de la Fuente MG, Núñez M, Pérez-Hernández M, Moraleda I, Gálvez E, Iriepa I, Tamargo J, Caballero R, Delpón E. Propafenone blocks human cardiac Kir2.x channels by decreasing the negative electrostatic charge in the cytoplasmic pore. *Biochem Pharmacol*. 2013;**86**:267-78.
- Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 1996;**491**:31-50.
- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000;**403**:553-556.
- Andelfinger G, Tapper AR, Welch RC, Vanoye CG, George AL Jr, Benson DW. KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and



- skeletal muscle phenotypes. *Am J Hum Genet* 2002;**71**:663-668.
- Anumonwo JMB, Lopatin AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:45-54.
- Antzelevitch C. The Brugada syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;**12**:268-272.
- Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Towbin JA, Nademanee K. Brugada syndrome: 1992-2002: a historical perspective. *J Am Coll Cardiol* 2003;**41**:1665-71.
- Antzelevitch C. Cellular basis for the repolarization waves of the ECG. *Ann N Y Acad Sci* 2006;**1080**:268-81.
- Antzelevitch C, Burashnikov A, Sicouri S, Belardinelli L. Electrophysiologic basis for the antiarrhythmic actions of ranolazine. *Heart Rhythm* 2011;**8**:1281-90.
- Antzelevitch C. Genetic, molecular and cellular mechanisms underlying the J wave syndromes. *Circ J* 2012;**76**:1054-65.
- Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated  $K^+$  currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1991;**97**:973-1011.
- Arakel EC, Brandenburg S, Uchida K, Zhang H, Lin YW, Kohl T, Schrüf B, Sulkin MS, Efimov IR, Nichols CG, Lehnart SE, Schwappach B. Tuning the electrical properties of the heart by differential trafficking of KATP ion channel complexes. *J Cell Sci* 2014;**127**:2106-19.
- Armstrong CM. Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion rejection in squid axons. *J Gen Physiol* 1969;**54**:553-575.
- Armstrong CM. Ionic pores, gates and gating currents. *Q Rev Biophys* 1974;**7**:179-210.
- Armstrong CM. Sodium channel and gating currents. *Physiol Rev* 1981;**61**:644-682.
- Armstrong CM, Bezanilla F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 1973;**242**:459-461.
- Armstrong CM, Bezanilla F. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* 1977;**70**:567-90.
- Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, Vege A, Wang DW, Rhodes TE, George AL Jr, Schwartz PJ. Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* 2007 23;**115**:361-7.
- Asano Y, Davidenko JM, Baxter WT, Gray RA, Jalife J. Optical mapping of drug-induced polymorphic arrhythmias and torsade de pointes in the isolated rabbit heart. *J Am Coll Cardiol* 1997;**29**:831-42.
- Atienza F, Almendral J, Moreno J, Vaidyanathan R, Talkachou A, Kalifa J, Arenal A, Villacastin JP, Torrecilla EG, Sanchez A, Ploutz-Snyder R, Jalife J, Berenfeld O. Activation of inward rectifier potassium channels accelerates atrial fibrillation in humans: Evidence for a reentrant mechanism. *Circulation* 2006;**114**:2434-2442.
- Attwell D, Cohen I, Eisner D, Ohba M, Ojeda C. The steady state TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 1979;**379**:2:137
- Bähring R, Milligan CJ, Vardanyan V, Engeland B, Young BA, Dannenberg J, Waldschutz R, Edwards JP, Wray D, Pongs O. Coupling of voltage-dependent potassium channel inactivation and oxidoreductase active site of Kv $\beta$  subunits. *J Biol Chem* 2001;**276**:22923-22929.
- Baker RP, Harreman MT, Eccleston JF, Corbett AH, Stewart M. Interaction between Ran and Mog1 is required for efficient nuclear protein import. *J Biol Chem* 2001;**276**:41255-62.
- Balijepalli RC, Kamp TJ. Caveolae, ion channels and cardiac arrhythmias. *Prog Biophys Mol Biol* 2008;**98**:149-60.
- Balser JR, Nuss HB, Romashko DN, Marbán E, Tomaselli GF. Functional consequences of lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. *J Gen Physiol* 1996;**107**:643-658.
- Balser JR. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:599-613.
- Bankston JR, Kass RS. Molecular determinants of local anesthetic action of beta-blocking drugs: Implications for therapeutic management of long QT syndrome variant 3. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:246-53.
- Bao L, Kefaloyianni E, Lader J, Hong M, Morley G, Fishman GI, Sobie EA, Coetzee WA. Unique properties of the ATP-sensitive  $K_{ATP}$  channel in the mouse ventricular cardiac conduction system. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011;**4**(6):926-35.

- Barana A, Matamoros M, Dolz-Gaitón P, Pérez-Hernández M, Amorós I, Núñez M, Sacristán S, Pedraz Á, Pinto Á, Fernández-Avilés F, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Chronic atrial fibrillation increases microRNA-21 in human atrial myocytes decreasing L-type calcium current. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014;**7**:861-8.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. KvLQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the  $I_{Ks}$  cardiac potassium current. *Nature* 1996;**384**:78-80.
- Baronas VA, Kurata HT. Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Front Physiol*. 2014;**27**:5:325.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;**116**:281-97.
- Bartolome J, Huguenard J, Slotkin TA. Role of ornithine decarboxylase in cardiac growth and hypertrophy. *Science* 1980;**210**:793-794.
- Baukrowitz T, Tucker SJ, Schulte U, Benndorf K, Ruppersberg JP, Fakler B. Inward rectification in KATP channels: a pH switch in the pore. *EMBO J*. 1999;**18**:847-53.
- Baumgarten CM, Isenberg G, McDonald TF, Ten Eick RE. Depletion and accumulation of potassium in the extracellular clefts of cardiac Purkinje fibers during voltage clamp hyperpolarization and depolarization: experiments in sodium-free bathing media. *J Gen Physiol* 1977;**70**:149-169.
- Beaumont J, Davidenko N, Davidenko JM, Jalife J. Spiral waves in two-dimensional models of ventricular muscle: formation of a stationary core. *Biophys J* 1998;**75**:1-14.
- Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 1989;**51**:367-384.
- Beeler GW, Reuter H. Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. *J Physiol* 1970;**207**:165-190.
- Beeler GW, Reuter H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibers. *J Physiol* 1977;**268**:177-210.
- Belousov BP. Periodically acting reaction and its mechanism. *Collection of abstracts on radiation medicine* 1958;145-147.
- Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 1995;**376**:683-685.
- Benson DW, Wang DW, Dyment M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL Jr. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest* 2003;**112**:1019-1028.
- Berenfeld O, Zaitsev AV, Mironov SF, Pertsov AM, Jalife J. Frequency-dependent breakdown of wave propagation into fibrillatory conduction across the pectinate muscle network in the isolated sheep right atrium. *Circ Res* 2002;**90**:1173-1180.
- Berenfeld O, JALIFE J. Mechanisms of Atrial Fibrillation: Rotors, Ionic Determinants and Excitation Frequency. *Cardiol Clin* 2014;**32**: 495-506.
- Berezuk MA, Schroer TA. Dynactin enhances the processivity of kinesin-2. *Traffic*. 2007;**8**:124-9.
- Bers DM, Pérez-reyes E.  $Ca^{2+}$  channels in cardiac myocytes: structure and function in  $Ca^{2+}$  influx and intracellular  $Ca^{2+}$  release. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:339-360.
- Bertaso F, Sharpe CC, Hendry BM, James AF. Expression of voltage-gated  $K^{+}$  channels in human atrium. *Basic Res Cardiol* 2002;**97**:424-433.
- Bertram PG, Zeng C, Thorson J, Shaw AS, Zheng XF. The 14-3-3 proteins positively regulate rapamycin-sensitive signaling. *Curr Biol*. 1998;**8**:1259-67.
- Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Alterations of  $K^{+}$  currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:379-385.
- Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 2000;**80**:555-592.
- Bezanilla F. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 2002;**120**:465-473.
- Bezzina C, Veldkamp MW, van Den Berg MP, Postma AV, Rook MB, Viersma JW, van Langen IM, Tan-Sindhunata G, Bink-Boelkens MT, van Der Hout AH, Mannens MM, Wilde AA. A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res*. 1999;**85**(12):1206-13.
- Bhargava A, Lin X, Novak P, Mehta K, Korchev Y, Delmar M, Gorelik J. Super-resolution scanning patch clamp reveals clustering of functional ion channels in adult ventricular myocyte. *Circ Res* 2013;**112**:1112-1120.

- Bhat HF, Adams ME, Khanday FA. Syntrophin proteins as Santa Claus: role(s) in cell signal transduction. *Cell Mol Life Sci.* 2013;**70**:2533-54.
- Bianchi L, Roy ML, Taglialatela M, Lundgren DW, Brown AM, Ficker E. Regulation by spermine of native inward rectifier K<sup>+</sup> channels in RBL-1 cells. *J Biol Chem* 1996;**271**:6114-6121.
- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M. The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_1$  subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the  $\beta$  subunit. *Neuron* 2000;**25**:177-190.
- Biermans G, Vereecke J, Carmeliet E. The mechanism of the inactivation of the inward-rectifying K<sup>+</sup> current during hyperpolarizing steps in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 1987;**410**:604-613.
- Bissay V, Van Malderen SCh, Keymolen K, Lissens W, Peeters U, Daneels D, Jansen AC, Pappaert G, Brugada P, De Keyser J, Van Dooren S. SCN4A variants and Brugada syndrome: phenotypic and genotypic overlap between cardiac and skeletal muscle sodium channelopathies. *Eur J Hum Genet.* 2016;**24**:400-7.
- Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 2005;**115**:3306-3317.
- Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999;**44**:121-131.
- Bowditch H. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskel fagnen des Herzens zeigen. *Arb Physiol Anstalt* 1871;**6**:139-176.
- Boyett MR. A study of the effect of the rate of stimulation on the transient outward current in the sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1981;**319**:1-22.
- Braun AP, Fedida D, Giles WR. Activation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors modulates the inwardly rectifying potassium currents of mammalian atrial myocytes. *Pflügers Arch* 1992;**421**:431-439.
- Brehm P, Eckert R. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* 1978;**202**:1203-1206.
- Breitwieser GE, Szabo G. Mechanism of muscarinic receptor-induced K<sup>+</sup> channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J Gen Physiol* 1988;**91**:469-493.
- Brendel J, Peukert S. Blockers of the Kv1.5 channels for treatment of atrial arrhythmias. *Exp Opin Ther Pat* 2002;**12**:1589-1598.
- Brette F, Orchard CH. Density and sub-cellular distribution of cardiac and neuronal sodium channel isoforms in rat ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006a;**348**:1163-6.
- Brette F, Orchard CH. No apparent requirement for neuronal sodium channels in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 2006b;**98**:667-74.
- Brooksby P, Levy AJ, Jones JV. The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1993;**11**:611-622.
- Broussard JA, Rappaz B, Webb DJ, Brown CM. Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat Protoc.* 2013;**8**:265-81.
- Brown AM, Lee KS, Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol* 1981;**318**:479-500.
- Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol* 1992;**20**:1391-1396.
- Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM. Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricles. *J Physiol* 2004;**559**:103-120.
- Buraci Z, Yang J. The  $\beta$  subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Physiol Rev.* 2010;**90**:1461-506.
- Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpón E, Hu D, Desai M, Borggrefe M, Häissaguerre M, Kanter R, Pollevick GD, Guerchicoff A, Laiño R, Marieb M, Nademanee K, Nam GB, Robles R, Schimpf R, Stapleton DD, Viskin S, Winters S, Wolpert C, Zimmern S, Veltmann C, Antzelevitch C. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm.* 2010;**7**:1872-82.
- Burnashev NA, Zilberter YU I. Two types of single inward rectifying potassium channels in rat myocardial cells. *Gen Physiol Biophys* 1986;**5**:495-504.
- Caballero R, Moreno I, González T, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* 2002;**56**:104-117.

- Caballero R, Moreno I, González T, Arias C, Valenzuela C, Delpón E, Tamargo J. Spironolactone and its main metabolite, canrenoic acid, block human ether-a-go-go-related gene channels. *Circulation* 2003;**107**:889-895.
- Caballero R, Gómez R, Moreno I, Nuñez L, González T, Arias C, Guizy M, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Interaction of angiotensin II with the angiotensin type 2 receptor inhibits the cardiac transient outward potassium current. *Cardiovasc Res*. 2004;**62**:86-95.
- Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M, Osuna L, Duarte J, López-Izquierdo A, Moraleda I, Gálvez E, Sánchez-Chapula JA, Tamargo J, Delpón E. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010a ;**107**:15631-6.
- Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Osuna L, Almendral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol*. 2010b ;**55**:2346-54.
- Caballero R, García-Utrilla R, Amorós I, Matamoros M, Pérez-Hernández M, Tinaquero D, Alfayate S, Nieto-Marín P, Guerrero-Serna G, Liu Q, Ramos R, Ponce-Balbuena D, Herron T, Campbell K, Filgueiras-Rama D, Peinado R, López-Sendón JL, Jalife J, Delpón E, Tamargo J. Tbx20 Controls the Expression of the *KCNH2* gene and of hERG channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;**114**(3):E416-E425.
- Caldarera CM, Orlandini G, Casti A, Moruzzi G. Polyamine and nucleic acid metabolism in myocardial hypertrophy of the overloaded heart. *J Mol Cell Cardiol* 1974;**6**:95-103.
- Cannon SC, Brown RH, Corey DP. A sodium channel defect in hyperkalemic periodic paralysis: potassium induced failure of inactivation. *Neuron* 1991;**6**:619-626.
- Carmeliet E, Vereecke J. Electrogenesis of the action potential. En: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*. Berne R, Sperelakis N, Geiger S. American Physiological Society 1979:269-334.
- Carmeliet E, Mubagwa K. Characterization of the acetylcholine-induced potassium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1986;**371**:219-237.
- Carmeliet E. Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 1987;**408**:18-26.
- Carmeliet E. Mechanisms and control of repolarization. *Eur Heart J* 1993;**14** (Supp H):3-13.
- Casini S, Tan HL, Bhuiyan ZA, Bezzina CR, Barnett P, Cerbai E, Mugelli A, Wilde AA, Veldkamp MW. Characterization of a novel SCN5A mutation associated with Brugada syndrome reveals involvement of DIIS4-S5 linker in slow inactivation. *Cardiovasc Res*. 2007;**76**:418-29.
- Casini S, Tan HL, Demirayak I, Remme CA, Amin AS, Scicluna BP, Chatyan H, Ruijter JM, Bezzina CR, van Ginneken AC, Veldkamp MW. Tubulin polymerization modifies cardiac sodium channel expression and gating. *Cardiovasc Res*. 2010;**85**(4):691-700.
- Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;**26**:13-25.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005a;**57**:397-409.
- Catterall WA, Pérez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005b;**57**:411-425.
- Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol*. 2012;**590**:2577-89.
- Cens T, Mangoni ME, Richard S, Nargeot J, Charnet P. Coexpression of the  $\beta 2$  subunit does not induce voltage-dependent facilitation of the class C L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Pflügers Arch* 1996;**431**:771-774.
- Cerrone M, Noujaim S, Talkachova A, Talkachou A, Berenfeld O, Anumonwo J, Pandit SV, Vikstrom K, Napolitano C, Priori SG, Jalife J. Arrhythmogenic mechanisms in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res*. 2007;**101**:1039-48.
- Cerrone M, Lin X, Zhang M, Agullo-Pascual E, Pfenniger A, Chkourko Gusky H, Novelli V, Kim C, Tirasawadichai T, Judge DP, Rothenberg E, Chen HS, Napolitano C, Priori SG, Delmar M. Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype. *Circulation*. 2014;**129**(10):1092-103.

- Chakrabarti S, Wu X, Yang Z, Wu L, Yong SL, Zhang C, Hu K, Wang QK, Chen Q. MOG1 rescues defective trafficking of Na(v)1.5 mutations in Brugada syndrome and sick sinus syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013;**6**:392-401.
- Chatin B, Colombier P, Gamblin AL, Allouis M, Le Bouffant F. Dynamitin affects cell-surface expression of voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Biochem J*. 2014;**463**:339-49.
- Chen C, Cannon SC. Modulation of Na<sup>+</sup> channel inactivation by the  $\beta$ 1 subunit: a deletion analysis. *Pflügers Arch* 1995;**431**:186-195.
- Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-López R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998;**392**:293-296.
- Chen H, Kim LA, Rajan S, Xu S, Goldstein SA. Charybdotoxin binding in the  $I_{Ks}$  pore demonstrates two minK subunits in each channel complex. *Neuron* 2003a;**40**:15-23.
- Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003b;**299**:251-254.
- Chen J, Pan L, Wei Z, Zhao Y, Zhang M. Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites. *EMBO J* 2008;**27**:2113-2123.
- Chen-Izu Y, Shaw RM, Pitt GS, Yarov-Yarovoy V, Sack JT, Abriel H, Aldrich RW, Belardinelli L, Cannell MB, Catterall WA, Chazin WJ, Chiamvimonvat N, Deschenes I, Grandi E, Hund TJ, Izu LT, Maier LS, Maltsev VA, Marionneau C, Mohler PJ, Rajamani S, Rasmuson RL, Sobie EA, Clancy CE, Bers DM. Na<sup>+</sup> channel function, regulation, structure, trafficking and sequestration. *J Physiol*. 2015;**593**(6):1347-60.
- Cheng RC, Tikhonov DB, Zhorov BS. Structural model for phenylalkylamine binding to L-type calcium channels. *J Biol Chem*. 2009;**284**:28332-42.
- Cheng J, Valdivia CR, Vaidyanathan R, Balijepalli RC, Ackerman MJ, Makielski JC. Caveolin-3 suppresses late sodium current by inhibiting nNOS-dependent S-nitrosylation of SCN5A. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;**61**:102-10.
- Chiamvimonvat N, Kargacin ME, Clark RB, Duff HJ. Effects of intracellular calcium on sodium current density in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 1995;**483**(2):307-18.
- Chiamvimonvat N, Chen-Izu Y, Clancy CE, Deschenes I, Dobrev D, Heijman J, Izu L, Qu Z, Ripplinger CM, Vandenberg JJ, Weiss JN, Koren G, Banyasz T, Grandi E, Sanguinetti MC, Bers DM, Nerbonne JM. Potassium currents in the heart: Functional roles in repolarization, arrhythmia and therapeutics. *J Physiol*. 2016.
- Chimura T, Launey T, Ito M. Evolutionarily conserved bias of amino-acid usage refines the definition of PDZ-binding motif. *BMC Genomics*. 2011;**12**:300.
- Cho HS, Takano M, Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J Physiol* 2003;**550**:169-180.
- Chockalingam PS, Gee SH, Jarrett H. Pleckstrin homology domain 1 of mouse  $\alpha$ -1-syntrophin binds phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* 1999;**38**:5596-5602.
- Choe H, Sackin H, Palmer LG. Permeation properties of inward-rectifier potassium channels and their molecular determinants. *J Gen Physiol* 2000;**115**:391-404.
- Choe S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 2002;**3**:115-121.
- Choi KL, Mossman C, Aube J, Yellen G. The internal quaternary ammonium receptor site of *Shaker* potassium channels. *Neuron* 1993;**10**:533-541.
- Choi BR, Burton F, Salama G. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> triggers early afterdepolarizations and Torsade de Pointes in rabbit hearts with type 2 long QT syndrome. *J Physiol*. 2002;**543**:615-31.
- Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. Properties of KvLQT1 K<sup>+</sup> channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* 1997;**16**:5472-5479.
- Christe G. Localization of K<sup>+</sup> channels in the tubules of cardiomyocytes as suggested by the parallel decay of membrane capacitance,  $I_{K1}$  and  $I_{K,ATP}$  during culture and by delayed  $I_{K1}$  response to barium. *J Mol Cell Cardiol* 1999;**31**:2207-2213.
- Christie MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 1990;**4**:405-411.

- Clark RB, Sanchez-Chapula J, Salinas-Stefanon E, Duff HJ, Giles WR. Quinidine-induced open channel block of  $K^+$  current in rat ventricle. *Br J Pharmacol*. 1995;**115**:335–343.
- Clark RB, Tremblay A, Melnyk P, Allen BG, Giles WR, Fiset C. T-tubule localization of the inward-rectifier  $K^+$  channel in mouse ventricular myocytes: a role in  $K^+$  accumulation. *J Physiol* 2001;**537**:979–992.
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002;**18**:637–706.
- Clarkson CW, Matsubara T, Hondeghem LM. Slow inactivation of  $V_{max}$  in guinea-pig ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1984;**247**:H645–H654.
- Clatot J, Ziyadeh-Isleem A, Maugendre S, Denjoy I, Liu H, Dilanian G, Hatem SN, Deschênes I, Coulombe A, Guicheney P, Neyroud N. Dominant-negative effect of SCN5A N-terminal mutations through the interaction of Na(v)1.5  $\alpha$ -subunits. *Cardiovasc Res*. 2012;**96**:53–63.
- Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev*. 2004;**84**:1341–79.
- Cohen SA, Levitt LK. Partial characterization of the rH1 sodium channel protein from rat heart using subtype-specific antibodies. *Circ Res*. 1993;**73**:735–42.
- Cohen NA, Brenman JE, Synder SH, Bredt DS. Binding of the inward rectifier  $K^+$  channel Kir2.3 to PSD-95 regulated by the protein kinase A phosphorylation. *Neuron* 1996;**17**:759–767.
- Cohen SS. A guide to the polyamines. *Oxford University Press* 1998.
- Collins A, LARSON M. Differential sensitivity of inward rectifier  $K^+$  channels to metabolic inhibitors. *J Biol Chem* 2002;**277**:35815–35818.
- Comtois P, Kneller J, Nattel S. Of circles and spirals: bridging the gap between the leading circle and spiral wave concepts of cardiac reentry. *Europace* 2005; **7** Suppl 2:10–20.
- Comtois P, Sakabe M, Vigmond EJ, Munoz M, Texier A, Shiroshita-Takeshita A y Nattel S. Mechanisms of atrial fibrillation termination by rapidly unbinding  $Na^+$  channel blockers: insights from mathematical models and experimental correlates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;**295**:H1489–H1504.
- Conti LR, Radeke CM, Shyng SL, Vandenberg CA. Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* 2001;**276**:41270–41278.
- Cooper PE, Sala-Rabanal M, Lee SJ, Nichols CG. Differential mechanisms of Cantú syndrome-associated gain of function mutations in the ABCC9 (SUR2) subunit of the KATP channel. *J Gen Physiol* 2015;**146**:527–40.
- Coraboeuf E, Otsuka M. L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de mammifères. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1956;**234**:441–444.
- Coraboeuf E, Carmeliet E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 1982;**392**:352–359.
- Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass R. Secondary structure of the human cardiac  $Na^+$  channel C terminus. Evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002;**277**:9233–9241.
- Coulombe A, Coraboeuf E. Simulation of potassium accumulation in clefts of Purkinje fibers: effect on membrane electrical activity. *J Theor Biol* 1983;**104**:211–229.
- Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L. *Shaker, Shal, Shab, and Shaw* express independent  $K^+$  current systems. *Neuron* 1991;**7**:763–773.
- Cranefield P, Aronson R. *Cardiac Arrhythmias: The role of trigger activity and other mechanisms*. Cranefield & Aronson. Futura 1975.
- Cronk LB, Ye B, Kaku T, Tester DJ, Vatta M, Makielski JC, Ackerman MJ. Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm*. 2007;**4**:161–6.
- Cunha SR, Mohler PJ. Cardiac ankyrins: Essential components for development and maintenance of excitable membrane domains in heart. *Cardiovasc Res*. 2006;**71**:22–9.
- Daimi H, Lozano-Velasco E, Haj Khelil A, Chibani JB, Barana A, Amorós I, González de la Fuente M, Caballero R, Aranega A, Franco D. Regulation of SCN5A by microRNAs: miR-219 modulates SCN5A transcript expression and the effects of flecainide intoxication in mice. *Heart Rhythm*. 2015;**12**:1333–42.
- Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, George AL Jr, Roden DM.

- Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation* 2008;**117**:1927-1935.
- Dascal N, Schreibmayer W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, Dimagno L, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, Lester HA, Davidson N. Atrial G protein-activated K<sup>+</sup> channel: Expression cloning and molecular properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:10235-10239.
- Davidenko JM, Kent PF, Chialvo DR, Michaels DC, Jalife J. Sustained vortex-like waves in normal isolated ventricular muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; **87**:8785-8789.
- De Waard M, Pragnell M, Campbell KP. Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved  $\beta$  subunit domain. *Neuron* 1994;**13**:495-503.
- Deacon SW, Serpinskaya AS, Vaughan PS, Lopez Fanarraga M, Vernos I, Vaughan KT, Gelfand VI. Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J Cell Biol*. 2003;**160**:297-301.
- Decher N, Uyguner O, Scherer CR, Karaman B, Yuksel-Apak M, Busch AE, Steinmeyer K, Wollnik B. hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:255-264.
- Decher N, Renigunta V, Zuzarte M, Soon M, Heinemann SH, Timothy KW, Keating MT, Daut J, Sanguinetti MC, Splawski I. Impaired interaction between the slide helix and the C-terminus of Kir2.1: A novel mechanism of Andersen syndrome. *Cardiovasc Res* 2007;**75**:748-757.
- Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson JG, Tinsley JM, Davies KE. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1997;**90**:717-27.
- Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in guinea pig ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res* 1995;**76**:223-235.
- Delpón E, Tamargo J. Electrofisiología cardíaca. En: *Fisiología Humana*. Tresguerres JAF. McGraw-Hill 2005:450-562.
- Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Lasrsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada Syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;**1**:209-218.
- Deo M, Ruan Y, Pandit SV, Shah K, Berenfeld O, Blafox A, Cerrone M, Noujaim SF, Denegri M, Jalife J, Priori SG. KCNJ2 mutation in short QT syndrome 3 results in atrial fibrillation and ventricular proarrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;**110**:4291-6.
- Deschênes I, Tomaselli GF. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett* 2002a;**528**:183-188.
- Deschênes I, Neyroud N, DiSilvestre D, Marbán E, Yue DT, Tomaselli GF. Isoform-specific modulation of voltage-gated Na(+) channels by calmodulin. *Circ Res*. 2002b;**90**(4):E49-57.
- Detta N, Frisso G, Salvatore F. The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 2015;**1854**:1502-9.
- Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, Anumonwo JM. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 2004;**94**:1332-1339.
- Dhamoon AS, Jalife J. The inward rectifier current ( $I_{K1}$ ) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2005;**2**:316-324.
- Diaz RJ, Zobel C, Cho HC, Batthish M, Hinek A, Backx PH, Wilson GJ. Selective inhibition of inward rectifier K<sup>+</sup> channels (Kir2.1 or Kir2.2) abolishes protection by ischemic preconditioning in rabbit ventricular cardiomyocytes. *Circ Res* 2004;**95**:325-332.
- DiFrancesco D, Ferroni A, Visentin S. Barium-induced blockade of the inward rectifier in calf Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 1984;**402**:446-453.
- Dilks D, Ling HP, Cockett M, Sokol P, Numann R. Cloning and expression of the human Kv4.3 potassium channel. *J Neurophysiol* 1999;**81**:1974-1977.
- Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. The role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 1996;**79**:659-668.
- Djurovic S, Iversen N, Jeansson S, Hoover F, Christensen G. Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes. *Mol Biotechnol*. 2004;**28**:21-32.

- Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C, Christ T, Schuler S, Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K<sup>+</sup> current ( $I_{K_{ACH}}$ ) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced  $I_{K_{ACH}}$  and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 2001;**104**:2551-2557.
- Dobrev D, Wettwer E, Kortner A, Knaut M, Schuler S, Ravens U. Human inward rectifier potassium channels in chronic and postoperative atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:397-404.
- Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U. The G protein-gated potassium current  $I_{K_{ACH}}$  is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005;**112**:3697-3706.
- Dolz-Gaitón P, Núñez M, Núñez L, Barana A, Amorós I, Matamoros M, Pérez-Hernández M, González de la Fuente M, Alvarez-López M, Macías-Ruiz R, Tercedor-Sánchez L, Jiménez-Jáimez J, Delpón E, Caballero R, Tamargo J. Functional characterization of a novel frameshift mutation in the C-terminus of the Nav1.5 channel underlying a Brugada syndrome with variable expression in a Spanish family. *PLoS One*. 2013;**8**:e81493.
- Domene C, Haider S, Sansom M. Ion channels structures: a review of recent progress. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003;**6**:611-619.
- Donaldson MR, Jensen JL, Tristani-Firouzi M, Tawil R, Bendahhou S, Suarez WA, Cobo AM, Poza JJ, Behr E, Wagstaff J, Szepietowski P, Pereira S, Mozaffar T, Escolar DM, Fu YH, Ptacek LJ. PIP<sub>2</sub> binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome. *Neurology* 2003;**60**:1811-1816.
- Döring F, Derst C, Wischmeyer E, Karschin C, Schneggenburger R, Daut J, Karschin A. The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K<sup>+</sup> permeation properties. *J Neurosci* 1998;**18**:8625-8636.
- Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C, Christ T, Schuler S, Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K<sup>+</sup> current ( $I_{K_{ACH}}$ ) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced  $I_{K_{ACH}}$  and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 2001;**104**:2551-2557.
- Doyle DA, Morais-Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 1998;**280**:69-77.
- Duden R. ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol Membr Biol*. 2003;**20**(3):197-207.
- Dumaine R, Wang Q, Keating M, Hartmann H, Schwartz P, Brown A, Kirsch G. Multiple mechanisms of Na<sup>+</sup> channel-linked long-QT syndrome. *Circ Res* 1996;**78**:916-924.
- Eaholtz G, Scheuer T, Catterall WA. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 1994;**12**:1041-1048.
- Echeverri CJ, Paschal BM, Vaughan KT, Vallee RB. Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J Cell Biol* 1996;**132**:617-633.
- Eckhardt LL, Farley AL, Rodríguez E, Ruwaldt K, Hammill D, Tester DJ, Ackerman MJ, Makielski JC. KCNJ2 mutations in arrhythmia patients referred for LQT testing: a mutation T305A with novel effect on rectification properties. *Heart Rhythm* 2007;**4**:323-329.
- Egan ME, Glöckner-Pagel J, Ambrose C, Cahill PA, Pappoe L, Balamuth N, Cho E, Canny S, Wagner CA, Geibel J, Caplan MJ. Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. *Nat Med*. 2002;**8**(5):485-92.
- Ehmsen J, Poon E, Davies K. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci*. 2002;**115**:2801-3.
- Eichel CA, Beuriot A, Chevalier MY, Rougier JS, Louault F, Dilanian G, Amour J, Coulombe A, Abriel H, Hatem SN, Balse E. Lateral Membrane-Specific MAGUK CASK Down-Regulates Nav1.5 Channel in Cardiac Myocytes. *Circ Res* 2016;**119**(4):544-56.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;**411**:494-8.
- Eldstrom J, Choi WS, Steele DF, Fedida D. SAP97 increases Kv1.5 currents through an indirect N-terminal mechanism. *FEBS Lett*. 2003;**547**:205-11.
- Ellinor PT, Nam EG, Shea MA, Milan DJ, Ruskin JN, MacRae CA. Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2008;**5**:99-105.
- Escande D, Coulombe A, Faivre JF, Deroubaix E, Coraboeuf E. Two types of transient outward currents in adult human atrial cells. *Am J Physiol* 1987;**252**:H142-H148.



- Fakler B, Braendle U, Bond C, Glowatzki E, König C, Adelman JP, Zenner HP, Ruppersberg JP. A structural determinant of differential sensitivity of cloned inward rectifier K<sup>+</sup> channels to intracellular spermine. *FEBS Lett* 1994;**356**:199-203.
- Fakler B, Braendle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner HP, Ruppersberg JP. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K<sup>+</sup> channels is caused by intracellular spermine. *Cell* 1995;**80**:149-154.
- Fakler B, Bond CT, Adelman JP, Ruppersberg JP. Heterooligomeric assembly of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels from subunits of different subfamilies: Kir2.1 (IRK1) and Kir4.1 (BIR10). *Pflügers Arch* 1996a;**433**:77-83.
- Fakler B, Schultz JH, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner HP, Jan LY, Ruppersberg JP. Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *EMBO J* 1996b;**15**:4093-4099.
- Fan Z, Makielski JC. Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem* 1997;**272**:5388-5395.
- Fast VG, Kleber AG. Role of wavefront curvature in propagation of cardiac impulse. *Cardiovasc Res* 1997;**33**:258-271.
- Fatkin D; members of the CSANZ Cardiac Genetic Diseases Council Writing Group. Guidelines for the diagnosis and management of familial dilated cardiomyopathy. *Heart Lung Circ*. 2011;**20**:691-3.
- Fauconnier J, Lacampagne A, Rauzier JM, Vassort G, Richard S. Ca<sup>2+</sup>-dependent reduction of I<sub>K1</sub> in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure? *Cardiovasc Res* 2005;**68**:204-212.
- Fedida D, Braun AP, Giles WR.  $\alpha_1$ -Adrenoceptors reduce background K<sup>+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1991;**441**:673-684.
- Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K<sup>+</sup> channel current. *Circ Res* 1993;**73**:210-216.
- Feng J, Xu D, Wang Z, Nattel S. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: Properties and consequences. *Am J Physiol* 1998a;**275**:H1717-H1725.
- Feng J, Yue L, Wang Z, Nattel S. Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium. *Circ Res* 1998b;**83**:541-551.
- Fermini B, Wang Z, Duan D, Nattel S. Difference in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am J Physiol* 1992;**263**:H1747-H1754.
- Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Science* 1994;**266**:1068-1072.
- Filgueiras-Rama D, Martins RP, Mironov S, Yamazaki M, Calvo CJ, Ennis SR, Bandaru K, Noujaim SF, Kalifa J, Berenfeld O, Jalife J. Chloroquine terminates stretch-induced atrial fibrillation more effectively than flecainide in the sheep heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;**5**:561-70.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;**391**:806-11.
- Fontes MS, van Veen TA, de Bakker JM, van Rijen HV. Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1818**: 2020-2029.
- Fourie C, Li D, Montgomery JM. The anchoring protein SAP97 influences the trafficking and localisation of multiple membrane channels. *Biochim Biophys Acta*. 2014;**1838**:589-94.
- Fozzard HA, January CT, Makielski JC. New studies of the excitatory sodium currents in heart muscle. *Circ Res* 1985;**56**:475-485.
- Fozzard HA, Hanck DA, Makielski JC, Scanley BE, Sheets MF. Sodium channels in cardiac Purkinje cells. *Experientia* 1987;**43**:1162-1168.
- Franqueza L, Longobardo M, Vicente J, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ, Valenzuela C. Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res* 1997;**81**:1053-1064.
- Fujiwara Y, Kubo Y. Functional roles of charged amino acid residues on the wall of the cytoplasmic pore of Kir2.1. *J Gen Physiol* 2006;**127**:401-419.
- Furukawa T, Kimura S, Furukawa N, Bassett AL, Myerburg RJ. Potassium rectifier currents differ in myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ Res* 1992;**70**:91-103.
- Furukawa T, Bassett AL, Furukawa N, Kimura S, Myerburg RJ. The ionic mechanism of reperfusion-induced early afterdepolarizations in feline left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 1993;**91**:1521-1531.

- Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Halperin JL, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines; European Heart Rhythm Association; Heart Rhythm Society.. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation. *Circulation* 2006; **114**: e257-354.
- Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G, Leger J, Charpentier F, Christ T, Dobrev D, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005; **112**:471-481.
- Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007; **582**:675-693.
- Garneau L, Klein H, Parent L, Sauvé R. Contribution of cytosolic cysteine residues to the gating properties of the Kir2.1 inward rectifier. *Biophys J* 2003; **84**:3717-3729.
- Garrey WE. Auricular fibrillation. *Physiol Rev* 1924; **4**:215-50.
- Gavillet B, Rougier JS, Domenighetti AA, Behar R, Boixel C, Ruchat P, Lehr HA, Pedrazzini T, Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res*. 2006; **99**:407-14.
- Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci*. 1998; **18**:128-37.
- Gee SH, Quenneville S, Lombardo CR, Chabot J. Single-amino acid substitutions alter the specificity and affinity of PDZ domains for their ligands. *Biochemistry*. 2000; **39**:14638-46.
- Gee HY, Noh SH, Tang BL, Kim KH, Lee MG. Rescue of  $\Delta F508$ -CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell*. 2011; **146**(5):746-60.
- George AL Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* 2005; **125**:1990-1999.
- Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet*. 2004; **36**:1162-4.
- Giles WR, IMAIZUMI Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 1988; **405**:123-145.
- Gillet L, Rougier JS, Shy D, Sonntag S, Mougenot N, Essers M, Shmerling D, Balse E, Hatem SN, Abriel H. Cardiac-specific ablation of synapse-associated protein SAP97 in mice decreases potassium currents but not sodium current. *Heart Rhythm*. 2015; **12**:181-92.
- Gintant GA, Datyner NB, Cohen IS. Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys J* 1984; **45**:509-512.
- Godreau D, Vranckx R, Maguy A, Goyenvalle C, Hatem SN. Different isoforms of synapse-associated protein, SAP97, are expressed in the heart and have distinct effects on the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Kv1.5. *J Biol Chem*. 2003; **278**:47046-52.
- Goedhart J, von Stetten D, Noirclerc-Savoye M, Lelimosin M, Joosen L, Hink MA, van Weeren L, Gadella TW Jr, Royant A. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat Commun*. 2012; **3**:751.
- Goldman DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol* 1943; **27**:37-60.
- Gómez R, Núñez L, Caballero R, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E. Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid, block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1+minK channels. *Br J Pharmacol* 2005; **146**:146-161.
- Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, Calvo E, López JA, Klein H, Vaquero M, Osuna L, Atienza F, Almendral J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide increases cardiac IK1 by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res*. 2009; **105**:383-92.
- Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Amorós I, Barana A, de Prada T, Macaya C, Maroto L, Rodríguez E, Caballero R, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current ( $I_{to1}$ ). *Cardiovasc Res* 2008; **80**:375-384.

- Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, De Palm SH, Matamoros M, Núñez M, Pérez-Hernández M, Iriepa I, Tamargo J, Delpón E. Structural basis of drugs that increase cardiac inward rectifier Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res*. 2014;**104**:337-46.
- González de la Fuente M, Barana A, Gómez R, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Sacristán S, Atienza F, Pita A, Pinto A, Fernández-Avilés F, Caballero R, Tamargo J, Delpón E. Chronic atrial fibrillation up-regulates  $\beta$ 1-Adrenoceptors affecting repolarizing currents and action potential duration. *Cardiovasc Res*. 2013;**97**:379-88.
- Gorostiza P, Guarner V, Cárdenas M, Valenzuela F. Effects of  $\alpha$ -adrenergic stimulation on time independent potassium current of isolated ventricular myocytes. *Life Sci* 1995;**56**:1407-1414.
- Grandi E, Sanguinetti MC, Bartos DC, Bers DM, Chen-Izu Y, Chiamvimonvat N, Colecraft HM, Delisle BP, Heijman J, Navedo MF, Noskov S, Proenza C, Vandenberg JJ, Yarov-Yarovoy V. Potassium channels in the heart: structure, function and regulation. *J Physiol*. 2016.
- Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin Invest* 2002;**110**:1201-1209.
- Grant AO. Basic Science for the Clinical Electrophysiologist. Cardiac Ion Channels. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2009;**2**:185-194.
- Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, Vliet S, Van Langen IM, Sandkuijl L, Smits JP, Hulsbeek M, Rook MB, Jongsma HJ, Wilde AA. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin 40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res* 2003;**92**:14-22.
- Gulbis JM, Mann S, MacKinnon R. Structure of a voltage-dependent  $K^+$  channel  $\beta$  subunit. *Cell* 1999;**97**:943-952.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:473-508.
- Haghighi M, Cavalli V, Shah SB, Schimmelpfeng K, Brusch R, Yang G, Herrera C, Pilling A, Goldstein LS. Dynactin is required for coordinated bidirectional motility, but not for dynein membrane attachment. *Mol Biol Cell*. 2007;**18**:2081-9.
- Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contributions of two types of calcium currents to the pacemaker potential of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 1988;**359**:233-253.
- Hall AE, Hutter OF, Noble D. Current-voltage relations in Purkinje fibres in sodium-deficient solutions. *J Physiol* 1963;**166**:225-240.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981;**391**:85-100.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 1999;**286**:950-2.
- Hancox JC, Levi AJ, Witchel HJ. Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier  $K^+$  current during the cardiac ventricular action potential. *Pflügers Arch* 1998;**436**:843-853.
- Hansen SB, Tao X, MacKinnon R. Structural basis of PIP2 activation of the classical inward rectifier  $K^+$  channel Kir2.2. *Nature* 2011;**477**:495-8.
- Hansen SB. Lipid agonism: The PIP2 paradigm of ligand-gated ion channels. *Biochim Biophys Acta*. 2015;**1851**:620-8.
- Hassinen M, Paajanen V, Vornanen M. A novel inwardly rectifying  $K^+$  channel, Kir2.5, is upregulated under chronic cold stress in fish cardiac myocytes. *J Exp Biol* 2008;**211**:2162-2171.
- Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, Nishio Y, Sasaki K, Itoh H, Yokode M, Kita T, Horie M, Kimura T. A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res*. 2012;**93**:666-73.
- Haworth RA, Hunter DR, Berkoff HA. The isolation of  $Ca^{2+}$ -resistant myocytes from the adult rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1980;**12**:715-23.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson R, MacKinnon R. Mutations in the  $K^+$  channel signature sequence. *Biophys J* 1994;**66**:1061-1067.
- Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992;**356**:441-443.
- Hennessey JA, Marcou CA, Wang C, Wei EQ, Wang C, Tester DJ, Torchio M, Dagradi F, Crotti L, Schwartz PJ,

- Ackerman MJ, Pitt GS. FGF12 is a candidate Brugada syndrome locus. *Heart Rhythm*. 2013;**10**:1886-94.
- Henry PC, Kanelis V, O'Brien MC, Kim B, Gautschi I, Forman-Kay J, Schild L, Rotin D. Affinity and specificity of interactions between Nedd4 isoforms and the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem*. 2003;**278**:20019-28.
- Herfst LJ, Rook MB, Jongsma HJ. Trafficking and functional expression of cardiac Na<sup>+</sup> channels. *J Mol Cell Cardiol* 2004;**36**:185-193.
- Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature*. 1987;**329**:219-22.
- Herren AW, Weber DM, Rigor RR, Margulies KB, Phinney BS, Bers DM. CaMKII Phosphorylation of Na(V)1.5: Novel in Vitro Sites Identified by Mass Spectrometry and Reduced S516 Phosphorylation in Human Heart Failure. *J Proteome Res*. 2015;**14**:2298-311.
- Herron TJ, Rocha AM, Campbell KF, Ponce-Balbuena D, Willis BC, Guerrero-Serna G, Liu Q, Klos M, Musa H, Zarzoso M, Bizy A, Furness J, Anumonwo J, Mironov S, Jalife J. Extracellular Matrix-Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Monolayer Structure and Electrophysiological Function. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2016;**9**(4):e003638.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews* 2010;**90**:291-366.
- Hilgemann DW, Ball R. Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange and K<sub>ATP</sub> potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science* 1996;**273**:956-959.
- Hilgemann DW. Cytoplasmic ATP-dependent regulation of ion transporters and channels: mechanisms and messengers. *Annu Rev Physiol* 1997;**59**:193-220.
- Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C. The complex and intriguing lives of PIP<sub>2</sub> with ion channels and transporters. *Sci STKE* 2001;**2001**(111):RE19.
- Hille B. *Ion channels of excitable membranes*. Hille B. Sinauer 2001.
- Hiraoka M, Kawano S. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1989;**410**:187-212.
- Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;**10**:682-696.
- Hirschberg B, Rovner A, Lieberman M, Patlak J. Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol* 1995;**106**:1053-1068.
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993;**362**:31-38.
- Hocini M, Nault I, Wright M, Veenhuyzen G, Narayan SM, Jaïs P, Lim KT, Knecht S, Matsuo S, Forclaz A, Miyazaki S, Jadidi A, O'Neill MD, Sacher F, Clémenty J, Haïssaguerre M. Disparate evolution of right and left atrial rate during ablation of long lasting persistent atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**:1007-1016.
- Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol* 1949;**108**:37-77.
- Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 1952a;**116**:473-496.
- Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to induction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952b;**117**:500-544.
- Hoffman B, Cranefield P. *Electrophysiology of the heart*. Hoffman B, Cranefield P. McGraw-Hill 1960.
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 1994;**17**:399-418.
- Hondeghem LM, Katzung BG. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 1977;**472**:373-398.
- Hondeghem LM. Validity of V<sub>max</sub> as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. *Biophys J* 1978;**23**:147-152.
- Hoogendijk MG, Opthof T, Postema PG, Wilde AA, de Bakker JM, Coronel R. The Brugada ECG pattern: a marker of channelopathy, structural heart disease, or neither? Toward a unifying mechanism of the Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2010;**3**(3):283-90.
- Horie M, Irisawa H, Noma A. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1987;**387**:251-272.

- Horn R, Patlak J, Stevens CF. Sodium channels need not open before they inactivate. *Nature* 1981;**291**:426-427.
- Hu D, Barajas-Martínez H, Burashnikov E, Springer M, Wu Y, Varro A, Pfeiffer R, Koopmann TT, Cordeiro JM, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C. A mutation in the  $\beta 3$  subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;**2**:270-278.
- Hu D, Barajas-Martínez H, Pfeiffer R, Dezi F, Pfeiffer J, Buch T, Betzenhauser MJ, Belardinelli L, Kahlig KM, Rajamani S, DeAntonio HJ, Myerburg RJ, Ito H, Deshmukh P, Marieb M, Nam GB, Bhatia A, Hasdemir C, Haïssaguerre M, Veltmann C, Schimpf R, Borggrefe M, Viskin S, Antzelevitch C. Mutations in SCN10A are responsible for a large fraction of cases of Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jul 8;**64**:66-79.
- Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan NY, Jan LY. Evidence that direct binding of Gbg to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying  $K^+$  channel is important for channel activation. *Neuron* 1995;**15**:1133-1143.
- Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by  $PIP_2$  and its stabilization by  $G_{\beta\gamma}$ . *Nature* 1998;**391**:803-806.
- HUANG Y, Wang Z, Liu Y, Xiong H, Zhao Y, Wu L, Yuan C, Wang L, Hou Y, Yu G, Huang Z, Xu C, Chen Q, Wang QK.  $\alpha B$ -Crystallin Interacts with Nav1.5 and Regulates Ubiquitination and Internalization of Cell Surface Nav1.5. *J Biol Chem* 2016;**291**(21):11030-41.
- Hughes BA, Kumar G, Yuan Y, Swaminathan A, Yan D, Sharma A, Plumley L, Yang-Feng TL, Swaroop A. Cloning and functional expression of human retinal Kir2.4, a pH-sensitive inwardly rectifying  $K^+$  channel. *Am J Physiol* 2000;**279**:C771-C784.
- Hund TJ, Koval OM, Li J, Wright PJ, Qian L, Snyder JS, Gudmundsson H, Kline CF, Davidson NP, Cardona N, Rasband MN, Anderson ME, Mohler PJ. A  $\beta$ (IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest*. 2010;**120**(10):3508-19.
- Hutter OF, Noble D. Rectifying properties of cardiac muscle. *Nature* 1960;**188**:495.
- Inanobe A, Fujita A, Ito M, Tomoike H, Inagada K, Kurachi Y. Inwardly rectifier  $K^+$  channel Kir2.3 is localized at the postsynaptic membrane of excitatory synapses. *Am J Physiol* 2002;**282**:C1396-C1403.
- Inomata N, Ohno T, Ishihara T, Akaike N. Antiarrhythmic agents act differently on the activation phase of the ACh-response in guineapig atrial myocytes. *Br J Pharmacol* 1993;**108**:111-115.
- Ishihara K. Time-dependent outward currents through the inward rectifier potassium channel IRK1. The role of weak blocking effects. *J Gen Physiol* 1997;**109**:229-243.
- Ishihara K, Ehara T. A repolarization-induced transient increase in the outward current of the inward rectifier  $K^+$  channel in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 1998;**510**:755-771.
- Isom LL, Catterall WA.  $Na^+$  channel subunits and Ig domains. *Nature* 1996;**383**:307-308.
- Ito H, Takikawa R, Kurachi Y, Sugimoto T. Anticholinergic effect of verapamil on the muscarinic acetylcholine receptor-gated  $K_1$  channel in isolated guinea-pig atrial myocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989;**339**:244-246.
- Ito H, Vereecke J, Carmeliet E. Intracellular protons inhibit inward rectifier  $K^+$  channel of guinea-pig ventricular cell membrane. *Pflügers Arch* 1992;**422**:280-286.
- Ivarsson Y. Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling. *FEBS Lett*. 2012;**586**:2638-47.
- Iwata Y, Shigekawa M, Wakabayashi S. Cardiac syntrophin isoforms: species-dependent expression, association with dystrophin complex and subcellular localization. *Mol Cell Biochem*. 2005;**268**:59-66.
- Jalife J, Berenfeld O, Skanes A, Mandapati R. Mechanisms of atrial fibrillation: Mother rotors or multiple daughter wavelets, or both? *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;**9**:S2-S12.
- Jalife J, Berenfeld O, Mansour M. Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:204-216.
- Jalife J. Rotors and spiral waves in atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;**14**:776-780.
- Jalife J, Berenfeld O. Molecular mechanisms and global dynamics of fibrillation: an integrative approach to the underlying basis of vortex-like reentry. *J Theor Biol* 2004;**230**:475-487.
- Jalife J, Pandit SV. Ionic mechanisms of wavebreak in fibrillation. *Heart Rhythm* 2005;**2**:660-663.
- Jalife J. Déjà vu in the theories of atrial fibrillation dynamics. *Cardiovasc Res* 2011;**89**:766-75.

- Jan LY, Barbel S, Timpe L, Laffer C, Salkoff L, O'Farrell P, Jan YN. Mutating a gene for a potassium channel by hybrid dysgenesis: an approach to the cloning of the *Shaker* locus in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983;**48**:233-245.
- Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology* 2005;**20**:408-416.
- Ji S, John SA, Lu Y, Weiss JN. Mechanosensitivity of the cardiac muscarinic potassium channel. A novel property conferred by Kir3.4 subunit. *J Biol Chem* 1998;**273**:1324-1328.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 2002a;**417**:515-522.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 2002b;**417**:523-526.
- Jing Y, Wenyu W, Weiguang X, Jia-fu L, Marvin EA, Froehner SC, Mingjie Z. Structure of the split PH domain and distinct lipid binding properties of the PH-PDZ supramodule of  $\alpha$ -syntrophin. *EMBO J* 2005;**24**:3985-3995.
- John SA, Xie LH, Weiss JN. Mechanism of inward rectification in Kir channels. *J Gen Physiol* 2004;**123**:623-625.
- Johnson ES. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 2004;**73**:355-382.
- Jones E, Roti Roti EC, Wang J, Delfosse SA, Robertson GA. Cardiac  $I_{Kr}$  channels minimally comprise hERG 1a and 1b subunits. *J Biol Chem* 2004;**279**:44690-44694.
- Josephson IR, Sánchez-Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 1984;**54**:157-162.
- Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a metanolsulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier  $K^+$  current by dofetilide. *Circ Res* 1993;**72**:75-83.
- Kääb S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 1998;**98**:1383-1393.
- Kalifa J, Jalife J, Zaitsev AV, Bagwe S, Warren M, Moreno J, Berenfeld O, Nattel S. Intra-atrial pressure increases rate and organization of waves emanating from the superior pulmonary veins during atrial fibrillation. *Circulation* 2003;**108**:668-671.
- Kalifa J, Tanaka K, Zaitsev AV, Warren M, Vaidyanathan R, Auerbach D, Pandit S, Vikstrom KL, Ploutz-Snyder R, Talkachou A, Atienza F, Guiraudon G, Jalife J, Berenfeld O. Mechanisms of wave fractionation at boundaries of high-frequency excitation in the posterior left atrium of the isolated sheep heart during atrial fibrillation. *Circulation* 2006;**113**:626-633.
- Kang MG, Campbell KP.  $\gamma$  subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 2003;**278**:21315-21318.
- Kass RS, Sanguinetti MC. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol* 1984;**84**:705-726.
- Kattygnarath D, Maugendre S, Neyroud N, Balse E, Ichai C, Denjoy I, Dilanian G, Martins RP, Fressart V, Berthet M, Schott JJ, Leenhardt A, Probst V, Le Marec H, Hainque B, Coulombe A, Hatem SN, Guicheney P. MOG1: a new susceptibility gene for Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;**4**(3):261-8.
- Katz B. Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 1949;**2**:285-299.
- Kellenberg S, Scheuer T, Catterall W. Movement of the  $Na^+$  Channel Inactivation Gate during Inactivation. *J Biol Chem* 1996;**271**(48):30971-30979.
- Keller DI, Rougier JS, Kucera JP, Benammar N, Fressart V, Guicheney P, Madle A, Fromer M, Schläpfer J, Abriel H. Brugada syndrome and fever: genetic and molecular characterization of patients carrying SCN5A mutations. *Cardiovasc Res*. 2005;**67**:510-9.
- Kennedy MB. Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem Sci*. 1995;**20**:350.
- Kennedy ME, Nemec J, Clapham DE. Localization and interaction of epitope-tagged GIRK1 and CIR inward rectifier  $K^+$  channel subunits. *Neuropharmacol* 1996;**35**:831-839.
- Kenyon JL, Gibbons WR. 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1979;**73**:139-157.
- Kim YH, Xie F, Yashima M, Wu TJ, Valderrábano M, Lee MH, Ohara T, Voroshilovsky O, Doshi RN, Fishbein MC, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN, Karagueuzian HS, Chen PS. Role of papillary muscle in the generation and maintenance of reentry during



- ventricular tachycardia and fibrillation in isolated swine right ventricle. *Circulation* 1999;**100**:1450-9.
- Kim J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neuron* 2004a;**41**:745-754.
- Kim LA, Furst J, Butler MH, Xu S, Grigorieff N, Goldstein SA.  $I_{\text{to}}$  channels are octomeric complexes with four subunits of each Kv4.2 and  $\text{K}^+$  channel-interacting protein 2. *J Biol Chem* 2004b;**279**:5549-5554.
- Kim J, Noh SH, Piao H, Kim DH, Kim K, Cha JS, Chung WY, Cho HS, Kim JY, Lee MG. Monomerization and ER Relocalization of GRASP Is a Requisite for Unconventional Secretion of CFTR. *Traffic*. 2016;**17**(7):733-53.
- Kin Y, Misumi Y, Ikehara Y. Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *J Biochem* 2001;**129**:289-295.
- Kinseth MA, Anjard C, Fuller D, Guizzunti G, Loomis WF, Malhotra V. The Golgi-associated protein GRASP is required for unconventional protein secretion during development. *Cell*. 2007;**130**(3):524-34.
- Kirshenbaum LA, MacLellan WR, Mazur W, French BA, Schneider MD. Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest*. 1993;**92**:381-7.
- Kleiman RB, Houser SR. Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1989;**256**:H1450-H1461.
- Kline R, Morad M. Potassium efflux and accumulation in heart muscle. Evidence from  $\text{K}^+$  electrode experiments. *Biophys J* 1976;**16**:367-372.
- Kline RP, Cohen I, Falk R, Kupersmith J. Activity-dependent extracellular  $\text{K}^+$  fluctuations in canine Purkinje fibres. *Nature* 1980;**286**:68-71.
- Klockner U, Mikala G, Schwartz A, Varadi G. Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *J Biol Chem* 1996;**271**:22293-22296.
- Kneller J, Kalifa J, Zou R, Zaitsev AV, Warren M, Berenfeld O, Vigmond EJ, Leon LJ, Nattel S, Jalife J. Mechanisms of atrial fibrillation termination by pure sodium channel blockade in an ionically-realistic mathematical model. *Circ Res*. 2005;**96**:e35-47.
- Koch SE, Bodi I, Schwartz A, Varadi G. Architecture of  $\text{Ca}^{2+}$  channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *J Biol Chem* 2000;**275**:34493-34500.
- Komukai K, Brette F, Pascarel C, Orchard CH. Electrophysiological response of rat ventricular myocytes to acidosis. *Am J Physiol* 2002a;**283**:H412-H422.
- Komukai K, Brette F, Orchard CH. Electrophysiological response of rat atrial myocytes to acidosis. *Am J Physiol* 2002b;**283**:H715-H724.
- Kong W, Po S, Yamagishi T, Ashen MD, Stetten G, Tomaselli GF. Isolation and characterization of the human gene encoding  $I_{\text{to}}$ : further diversity by alternative mRNA splicing. *Am J Physiol* 1998;**275**:H1963-H1970.
- Koumi S, Arentzen CE, Backer CL, Wasserstrom JA. Alterations in muscarinic  $\text{K}^+$  channel response to acetylcholine and to G protein-mediated activation in atrial myocytes isolated from failing human hearts. *Circulation* 1994;**90**:2213-2224.
- Koumi S, Backer CL, Arentzen CE. Characterization of inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995a;**92**:164-174.
- Koumi S, Wasserstrom JA, Ten Eick RE.  $\beta$ -Adrenergic and cholinergic modulation of inward rectifier  $\text{K}^+$  channel function and phosphorylation in guinea-pig ventricle. *J Physiol* 1995b;**486**:661-678.
- Kourliouros A, Savelieva I, Kiotsekoglou A, Jahangiri M, Camm J. Current concepts in the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am Heart J* 2009; **157**:243-52.
- Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE. The G-protein-gated atrial  $\text{K}_1$  channel  $I_{\text{K,ACh}}$  is a heteromultimer of two inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel protein. *Nature* 1995;**374**:135-141.
- Krelenstein DJ, Plam MB, Brooks CM, Vassalle M. Factors affecting overdrive suppression of idioventricular pacemakers and associated potassium shifts. *J Electrocardiol*. 1978;**11**:3-10.
- Krinsky V. Spread of excitation in an inhomogeneous medium (state similar to cardiac fibrillation). *Biophysics* 1966; **11**:676-683.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993a;**362**:127-133.

- Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 1993b;**364**:802-806.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:509-526.
- Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of  $I_{to}$  and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001;**107**:801-813.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimer J, Curhbertson J, Ascroft FM, Ezaki T, Doyle DA. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 2003;**300**:1922-1926.
- Kuo A, Domene C, Johnson LN, Doyle DA, Venien-Bryan C. Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography. *Structure* 2005;**13**:1463-1472.
- Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T. Short-term desensitization of muscarinic  $K^+$  channel current in isolated atrial myocytes and possible role of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch* 1987; **410**:227-233.
- Kurata HT, Fedida D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;**92**:185-208.
- Kurata HT, Cheng WW, Arrabit C, Slesinger PA, Nichols CG. The role of the cytoplasmic pore in inward rectification of Kir2.1 channels. *J Gen Physiol* 2007;**130**:145-155.
- Kurokawa J, Abriel H, Kass RS. Molecular basis of the delayed rectifier current  $I_{Ks}$  in heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:873-882.
- Kuryshev YA, Gudz TI, Brown AM, Wible BA. KChAP as a chaperone for specific  $K^+$  channels. *Am J Physiol* 2000;**278**:C931-C941.
- Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Marec H. Novel *SCN5A* mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. 2001;**104**:3081-3086.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**:680-5.
- Lal A, Haynes SR, Gorospe M. Clean western blot signals from immunoprecipitated samples. *Molecular and cellular probes*. 2005;**19**(6):385-388.
- Lalik PH, Krafte DS, Volberg WA, Ciccarelli RB. Characterization of endogenous sodium channel gene expressed in Chinese hamster ovary cells. *Am J Physiol* 1993;**264**:C803-C809.
- Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 2004;**94**:1023-1031.
- Lang SE, Westfall MV. Gene transfer into cardiac myocytes. *Methods Mol Biol*. 2015;**1299**:177-90.
- Lazar S, Dixit S, Marchlinski FE, Callans DJ, Gerstenfeld EP. Presence of left-to-right atrial frequency gradient in paroxysmal but not persistent atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2004; **110**:3181-6
- Lee KS, Marbán E, Tsien RW. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 1985;**364**:395-411.
- Lee JK, John SA, Weiss JN. Novel gating mechanism of polyamine block in the strong inward rectifier K channel Kir2.1. *J Gen Physiol* 1999;**113**:555-564.
- Lee HJ, Zheng JJ. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal* 2010;**8**:8.
- Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation* 1995;**91**:1512-1519.
- Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev*. 1999;**79**:1317-72.
- Lemaitre G, Walker B, Lambert S. Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem*. 2003;**278**:27333-9.
- Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* 2000;**350**(1):1-18.
- Leo-Macias A, Agullo-Pascual E, Sanchez-Alonso JL, Keegan S, Lin X, Arcos T, Feng-Xia-Liang, Korchav



- YE, Gorelik J, Fenyő D, Rothenberg E, Rothenberg E, Delmar M. Nanoscale visualization of functional adhesion/excitability nodes at the intercalated disc. *Nat Commun.* 2016;**7**:10342.
- Leonoudakis D, Mailliard W, Wingerd K, Clegg D, Vandenberg C. Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J Cell Sci* 2001;**114**:987-998.
- Leonoudakis D, Conti LR, Anderson S, Radeke CM, McGuire LMM, Adams ME, Froehner SC, Yates JR 3<sup>rd</sup>, Vandenberg CA. Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J Biol Chem* 2004a;**279**:22331-22346.
- Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LM, Vandenberg CA. A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J Biol Chem.* 2004b;**279**:19051-63.
- Lewis T. The excitation wave in the heart. En: Lewis T. Lectures on the heart. New York. Ed: *PB Hoeber*. 1915; 3-31.
- Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996a;**78**:689-696.
- Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996b;**78**:903-915.
- Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M. Transmural heterogeneity of action potentials and I<sub>to1</sub> in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol* 1998;**275**:H369-H377.
- Li D, Zhang L, Kneller J, Nattel S. Potential ionic mechanism for repolarization differences between canine right and left atrium. *Circ Res.* 2001;**88**:1168-75.
- Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic up-regulation of I<sub>K1</sub> in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *Am J Physiol* 2004;**287**:H2790-H2802.
- Li Q, Huang H, Liu G, Lam K, et al. Gain-of-function mutation of Nav1.5 in atrial fibrillation enhances cellular excitability and lowers the threshold for action potential firing. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;**380**:132 - 137.
- Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K<sup>+</sup> channel. *Nature* 1991;**353**:752-756.
- Lin X, Liu N, Lu J, Zhang J, Anumonwo JM, Isom LL, Fishman GI, Delmar M. Subcellular heterogeneity of sodium current properties in adult cardiac ventricular myocytes. *Heart Rhythm.* 2011;**8**:1923-30.
- Lipp P, Huser J, Pott L, Niggli E. Spatially non-uniform Ca<sup>2+</sup> signals induced by the reduction of transverse tubules in citrate-loaded guinea-pig ventricular myocytes in culture. *J Physiol* 1996;**497**:589-597.
- Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacio JS, Klausner RD. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell.* 1989;**56**:801-813.
- Litovsky SH, Antzelevitch C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* 1988;**62**:116-126.
- Liu CJ, Dib-Hajj SD, Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J Biol Chem.* 2003;**278**:1029-36.
- Loewi O. Über Humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch* 1921;**189**:239-242.
- Loewi O, Navaratil E. Übertragbarkeit der Herznervenwirkung, X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoffs. *Pflügers Arch* 1926;**214**:678-688.
- Logothetis DE, Jin T, Lupyan D, Rosenhouse-Dantsker A. Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Pflügers Arch* 2007;**455**:83-95.
- Lomax AE, Kondo CS, Giles WR. Comparison of time- and voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in myocytes from left and right atria of adult mice. *Am J Physiol* 2003;**285**:H1837-H1848.
- London B, Trudeau MC, Newton KP, Beyer AK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Satler CA, Roberson GA. Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 1997;**81**:870-878.
- London B, Michalec M, Mehdi H, Zhu X, Kerchner L, Sanyal S, Viswanathan PC, Pfahnl AE, Shang LL, Madhusudanan M, Baty CJ, Lagana S, Aleong R, Gutmann R, Ackerman MJ, McNamara DM, Weiss R, Dudley SC Jr. Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na<sup>+</sup> current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* 2007;**116**:2260-2268.

- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 1994;**372**:366-369.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J Gen Physiol* 1995;**106**:923-955.
- Lopatin AN, Shantz LM, Mackintosh CA, Nichols CG, Pegg AE. Modulation of potassium channels in the hearts of transgenic and mutant mice with altered polyamine biosynthesis. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:2007-2024.
- Lopatin AN, Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: an update on  $I_{K1}$ . *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:625-638.
- Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP<sub>2</sub> interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002;**34**:933-944.
- Lopes CM, Remon JJ, Matavel A, Sui JL, Keselman I, Medei E, Shen Y, Rosenhouse-Dantsker A, Rohacs T, Logothetis DE. Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP<sub>2</sub>-sensitivity of K<sup>+</sup> channels. *Channels* 2007;**1**:124-134.
- Lou JY, Laezza F, Gerber BR, Xiao M, Yamada KA, Hartmann H, Craig AM, Nerbonne JM, Ornitz DM. Fibroblast growth factor 14 is an intracellular modulator of voltage-gated sodium channels. *J Physiol* 2005;**569**:179-93.
- Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**51**:288-98.
- Lu Z, MacKinnon R. Electrostatic tuning of Mg<sup>2+</sup> affinity in an inward-rectifier K<sup>+</sup> channel. *Nature* 1994;**371**:243-246.
- Lu T, Zhu YG, Yang J. Cytoplasmic amino and carboxyl domains form a wide intracellular vestibule in an inwardly rectifying potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:9926-9931.
- Lu T, Ting AY, Mainland J, Jan LY, Schultz PG, Yang J. Probing ion permeation and gating in a K<sup>+</sup> channel with backbone mutations in the selectivity filter. *Nat Neurosci* 2001;**4**:239-246.
- Lubitz SA, Benjamin EJ, Ellinor PT. Atrial fibrillation in congestive heart failure. *Heart Fail Clin* 2010;**6**:187-200.
- Lue WM, Boyden PA. Abnormal electrical properties of myocytes from chronically infarcted canine heart. *Circulation* 1992;**85**:1175-1188.
- Lundby A, Olesen N SP. KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**346**:958-967.
- Ma D, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN, Jan LY. Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 2001;**291**:316-9.
- Ma D, Taneja TK, Hagen BM, Kim BY, Ortega B, Lederer WJ, Welling PA. Golgi export of the Kir2.1 channel is driven by a trafficking signal located within its tertiary structure. *Cell* 2011;**145**:1102-15.
- MacKinnon R, YELLEN G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Science* 1990;**250**:276-279.
- MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991;**350**:232-235.
- Maier SK, Westenbroek RE, McCormick KA, Curtis R, Scheuer T, Catterall WA. Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* 2004;**109**:1421-7.
- Makara MA, Curran J, Little SC, Musa H, Polina I, Smith SA, Wright PJ, Unudurthi SD, Snyder J, Bennett V, Hund TJ, Mohler PJ. Ankyrin-G coordinates intercalated disc signaling platform to regulate cardiac excitability in vivo. *Circ Res* 2014;**115**:929-38.
- Makhina EN, Kelly AJ, Lopatin AN, Mercer RW, Nichols CG. Cloning and expression of a novel human brain inward rectifier potassium channel. *J Biol Chem* 1994;**269**:20468-20474.
- Makielski JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z, Kyle JW. Coexpression of  $\beta 1$  with cardiac sodium channel  $\alpha$  subunits in oocytes decreases lidocaine block. *Mol Pharmacol* 1996;**49**:30-39.
- Makielski JC, Farley A. Na<sup>+</sup> current in human ventricle: implications for sodium loading and homeostasis. *Journal Of Cardiovascular Electrophysiology* 2006;**17**:15-20.
- Makielski JC. Late sodium current: a mechanism for angina, heart failure, and arrhythmia. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2009;**54**:279-286.
- Makita N, Bennett PB, George AL Jr. Molecular determinants of  $\beta 1$  subunit-induced gating modulation

- in voltage-dependent  $\text{Na}^+$  channels. *J Neurosci* 1996;**16**:7117-7127.
- Makita N, Horie M, Nakamura T, Ai T, Sasaki K, Yokoi H, Sakurai M, Sakuma I, Otani H, Sawa H, Kitabatake A. Drug-induced long-QT syndrome associated with a subclinical SCN5A mutation. *Circulation* 2002;**106**:1269-1274.
- Mandapati R, Asano Y, Baxter WT, Gray R, Davidenko J, Jalife J. Quantification of effects of global ischemia on dynamics of ventricular fibrillation in isolated rabbit heart. *Circulation* 1998;**98**:1688-96.
- Mandapati R, Skanes A, Chen J, Berenfeld O, Jalife J. Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2000;**101**:194-199.
- Mansour M, Mandapati R, Berenfeld O, Chen J, Samie FH, Jalife J. Left-to-right gradient of atrial frequencies during acute atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2001;**103**:2631-2636.
- Mantegazza M, Yu FH, Catterall WA, Scheuer T. Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:15348-15353.
- Marangoni S, Di Resta C, Rocchetti M, Barile L, Rizzetto R, Summa A, Severi S, Sommariva E, Pappone C, Ferrari M, Benedetti S, Zaza A. A Brugada syndrome mutation (p.S216L) and its modulation by p.H558R polymorphism: standard and dynamic characterization. *Cardiovasc Res*. 2011;**91**(4):606-16.
- Marian AJ, Yu QT, Mann DL, Graham FL, Roberts R. Expression of a mutation causing hypertrophic cardiomyopathy disrupts sarcomere assembly in adult feline cardiac myocytes. *Circ Res*. 1995;**77**:98-106.
- Marionneau C, Abriel H. Regulation of the cardiac  $\text{Na}^+$  channel  $\text{NaV1.5}$  by post-translational modifications. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;**82**:36-47.
- Mark MD, Herlitze S. G-protein mediated gating of inward-rectifier  $\text{K}^+$  channels. *Eur J Biochem* 2000;**267**:5830-5836.
- Martens JR, Kwak YG, Tamkun MM. Modulation of  $\text{Kv}$  channel  $\alpha/\beta$  subunit interactions. *Trends Cardiovasc Med* 1999;**9**:253-258.
- Martin RL, Koumi S, Ten Eick RE. Comparison of the effects of internal  $[\text{Mg}^{2+}]$  on  $I_{\text{K1}}$  in cat and guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1995;**27**:673-691.
- Martin CA, Zhang Y, Grace AA, Huang CL. In vivo studies of  $\text{Scn5a}^{+/-}$  mice modeling Brugada syndrome demonstrate both conduction and repolarization abnormalities. *J Electrocardiol*. 2010;**43**(5):433-9.
- Mascher D, Peper K. Two components of inward current in myocardial muscle fibers. *Pflügers Arch* 1969;**307**:190-203.
- Maughan DW. Potassium movement during hyperpolarization of cardiac muscle. *J Memb Biol* 1976;**28**:241-262.
- Matamoros M, Pérez-Hernández M, Guerrero-Serna G, Amorós I, Barana A, Núñez M, Ponce-Balbuena D, Sacristán S, Gómez R, Tamargo J, Caballero R, Jalife J, Delpón E. Nav1.5 N-terminal domain binding to  $\alpha 1$ -syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovasc Res* 2016;**110**(2):279-90.
- Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying  $\text{K}$  channel and blocking by internal  $\text{Mg}^{2+}$ . *Nature* 1987;**325**:156-159.
- Matsuda H. Open-state substructure of inwardly rectifying potassium channels revealed by magnesium block in guinea-pig heart cells. *J Physiol* 1988;**397**:237-258.
- Matsuda H, Cruz JdS. Voltage-dependent block by internal  $\text{Ca}^{2+}$  ions of inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1993;**470**:295-311.
- Mazzanti A, Maragna R, Faragli A, Monteforte N, Bloise R, Memmi M, Novelli V, Baiardi P, Bagnardi V, Etheridge SP, Napolitano C, Priori SG. Gene-Specific Therapy With Mexiletine Reduces Arrhythmic Events in Patients With Long QT Syndrome Type 3. *J Am Coll Cardiol*. 2016;**67**:1053-8.
- McAllister RE, Noble D. The time and voltage dependence of the slow outward current in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1966;**186**:632-662.
- McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of  $\text{Na}^+$  channel function in the extracellular domain of the  $\beta 1$  subunit. *J Biol Chem* 1998;**273**:3954-3962.
- McCormick KA, Srinivasan J, White K, Scheuer T, Catterall WA. The extracellular domain of the  $\beta 1$  subunit is both necessary and sufficient for  $\beta 1$ -like modulation of sodium channel gating. *J Biol Chem* 1999;**274**:32638-32646.
- McCrossan ZA, Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 2004;**47**:787-821.
- McIntosh MA, Cobbe SM, Kane KA, Rankin AC. Action potential prolongation and potassium currents in

- left ventricular myocytes isolated from hypertrophied rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1998;**30**:43-53.
- McLaughlin, M., Hale, R., Ellston, D., Gaudet, S., Lue, R. A., Viel, A. The Distribution and Function of Alternatively Spliced Insertions in hDlg. *J. Biol. Chem.* 2002;**277**:6406-6412.
- McLerie M, Lopatin A. Dominant-negative suppression of  $I_{K1}$  in the mouse heart leads to altered cardiac excitability. *J Mol Cell Cardiol* 2003;**35**:367-378.
- McNair WP, Ku L, Taylor MR, Fain PR, Dao D, Wolfel E, Mestroni L; Familial Cardiomyopathy Registry Research Group. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation*. 2004 12;**110**:2163-7.
- McNair WP, Sinagra G, Taylor MR, Di Lenarda A, Ferguson DA, Salcedo EE, Slavov D, Zhu X, Caldwell JH, Mestroni L; Familial Cardiomyopathy Registry Research Group. SCN5A mutations associate with arrhythmic dilated cardiomyopathy and commonly localize to the voltage-sensing mechanism. *J Am Coll Cardiol*. 2011;**57**:2160-8.
- Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusié-Luna MT, Makielski JC, Ackerman MJ. SCN4A-encoded sodium channel  $\beta 4$  subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2007;**60**:739-752.
- Melnyk P, Zhang L, Shrier A, Nattel S. Differential distribution of Kir2.1 and Kir2.3 subunits in canine atrium and ventricle. *Am J Physiol* 2002;**283**:H1123-H1133.
- Mercier A, Clément R, Harnois T, Bourmeyster N, Faivre JF, Findlay I, Chahine M, Bois P, Chatelier A. The  $\beta 1$ -subunit of Na(v)1.5 cardiac sodium channel is required for a dominant negative effect through  $\alpha$ - $\alpha$  interaction. *PLoS One*. 2012;**7**:e48690.
- Mercier A, Clément R, Harnois T, Bourmeyster N, Bois P, Chatelier A. Nav1.5 channels can reach the plasma membrane through distinct N-glycosylation states. *Biochim Biophys Acta*. 2015;**1850**:1215-23.
- Mezghrani A, Monteil A, Watschinger K, Sinnegger-Brauns MJ, Barrère C, Bourinet E, Nargeot J, Striessnig J, Lory P. A destructive interaction mechanism accounts for dominant-negative effects of misfolded mutants of voltage-gated calcium channels. *J Neurosci*. 2008;**28**(17):4501-11.
- Michael G, Xiao L, Qi XY, Dobrev D, Nattel S. Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2009;**81**:491-9
- Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Tang S, Schwartz A. Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel pore. *FEBS Lett* 1993;**335**:265-269.
- Mikala G, Klockner U, Varadi M, Eisfeld J, Schwartz A, Varadi G. cAMP-dependent phosphorylation sites and macroscopic activity of recombinant cardiac L-type calcium channels. *Mol Cell Biochem* 1998;**185**:95-109.
- Milstein ML, Musa H, Balbuena DP, Anumonwo JM, Auerbach DS, Furspan PB, Hou L, Hu B, Schumacher SM, Vaidyanathan R, Martens JR, Jalife J. Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;**109**:E2134-43.
- Mines G. On circulating excitations in heart muscles and their possible relation to tachycardia and fibrillation. *Trans R. Soc. Can.* 1914;**4**:43-52.
- Mitarai S, Reed TD, Yatani A. Changes in ionic currents and  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in hypertrophied myocytes overexpressing  $\text{G}\alpha_q$ . *Am J Physiol* 2000;**279**:H139-H148.
- Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ. Action potentials, ion channel currents and transverse tubule density in adult rabbit ventricular myocytes maintained for 6 days in cell culture. *Pflügers Arch* 1996;**431**:814-827.
- Mitcheson JS, Sanguinetti MC. Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 1999;**9**:201-216.
- Mitra R, Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;**83**:5340-5344.
- Moe GK Atrial fibrillation a self sustained arrhythmia independent of focal discharge *AM Hear J* 1959;**58**:59-70.
- Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J* 1964; **67**:200-220.
- Mohanty S, Ovee M, Banerjee M. PDZ Domain Recognition: Insight from Human Tax-Interacting Protein 1 (TIP-1) Interaction with Target Proteins. *Biology (Basel)* 2015; **4**(1): 88-103.
- Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG, Bennett V. Nav1.5 E1053K

- mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:17533-8.
- Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 2001;**414**:37-42.
- Morales MJ, Castellino RC, Crews AL, Rasmusson RL, Strauss HC. A novel  $\beta$  subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel  $\alpha$  subunits. *J Biol Chem* 1995;**270**:6272-6277.
- Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'ahan N, Vivaudou M. The molecular basis of the specificity of action of K<sub>ATP</sub> channel openers. *EMBO J* 2000;**19**:6644-6651.
- Moreau C, Prost AL, Derand R, Vivaudou M. SUR, ABC proteins targeted by K<sub>ATP</sub> channel openers. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**38**:951-963.
- Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Richardson PJ, Mizuguchi K, Jackson AP.  $\beta$ 3: An additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:2308-2313.
- Mori Y, Mikala G, Varadi G, Kobayashi T, Koch S, Wakamori M, Schwartz A. Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* 1996;**72**:83-109.
- Moric E, Herbert E, Trusz-Gluza M, Filipiecki A, Mazurek U, Wilczok T. The implications of genetic mutations in the sodium channel gene (SCN5A). *Europace* 2003;**5**:325-34.
- Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing: structural, functional, and electrophysiological characteristics of new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 1995;**91**:1588-1595.
- Morishige K, Takahashi N, Findlay I, Koyama H, Zanelli JS, Peterson C, Jenkins NA, Copeland NG, Mori N, Kurachi Y. Molecular cloning, functional expression and localization of an inward rectifier potassium channel in the mouse brain. *FEBS Lett* 1993;**336**:375-380.
- Morishige K, Takahashi N, Jahangir A, Yamada M, Koyama H, Zanelli JS, Kurachi Y. Molecular cloning and functional expression of a novel brain-specific inward rectifier potassium channel. *FEBS Lett* 1994;**346**:251-256.
- Morrison DK. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 2009;**19**:16-23.
- Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The Na<sup>+</sup> channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* 2004;**123**:155-165.
- Mrowiec T, Schwappach B. 14-3-3 proteins in membrane protein transport. *Biol Chem* 2006;**387**:1227-36.
- Mubagwa R, Flameng W, Carmeliet E. Resting and action potentials of non ischemic and chronically ischemic human ventricular muscle. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994;**5**:659-671.
- Muñoz V, Vaidyanathan R, Tolkacheva EG, Dhamoon AS, Taffet SM, Anumonwo JM. Kir2.3 isoform confers pH sensitivity to heteromeric Kir2.1/Kir2.3 channels in HEK293 cells. *Heart Rhythm* 2007;**4**:487-496.
- Murai T, Kakizuka A, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;**161**:176-181.
- Muramatsu H, Sato R, Okumura H. Early increase in K<sup>+</sup> conductance during metabolic inhibition by cyanide in guinea pig ventricular myocytes. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1990;**57**:308-321.
- Näbauer M, Beuckelmann DJ, Erdmann E. Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:386-394.
- Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 1996;**93**:168-177.
- Näbauer M, Kääh S. Potassium channel downregulation in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;**37**:324-334.
- Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 2003;**37**:449-461.
- Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow

- fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;**101**:10554-9.
- Nakahira K, Shi G, Rhodes KJ, Trimmer JS. Selective interaction of voltage-gated K<sup>+</sup> channel  $\beta$ -subunits with  $\alpha$ -subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:7084-7089.
- Nakamura TY, Artman M, Rudy B, Coetzee WA. Inhibition of rat ventricular  $I_{K1}$  with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *Am J Physiol* 1998;**274**:H892-H900.
- Nakano Y, Shimizu W. Genetics of long-QT syndrome. *J Hum Genet*. 2016;**61**:51-5.
- Napolitano C, Bloise R, Priori SG. Gene-specific therapy for inherited arrhythmogenic diseases. *Pharmacol Ther* 2006;**110**:1-13.
- Narayan SM, Krummen DE, Rappel WJ. Clinical mapping approach to diagnose electrical rotors and focal impulse sources for human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012; **5**:447-54.
- Nattel S, SINGH BN. Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions. *Am J Cardiol* 1999;**84**:11R-19R.
- Nattel S, Yue L, Wang Z. Cardiac ultrarapid delayed rectifiers. A novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* 1999;**9**:217-226.
- Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002;**415**:219-226.
- Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: Mechanisms and implications. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 2008;**1**:62-73.
- Nattel S, Frelin Y, Gaborit N, Louault C, Demolombe S. Ion channel mRNA expression profiling: Insights into cardiac remodeling and arrhythmic substrates. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:96-105.
- Nawathe PA, Kryukova Y, Oren RV, Milanese R, Clancy CE, Lu JT, Moss AJ, DiFrancesco D, Robinson RB. An LQTS6 MiRP1 mutation suppresses pacemaker current and is associated with sinus bradycardia. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2013;**24**:1021-7.
- Neher E. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 1992;**207**:123-131.
- Nehring RB, Wischmeyer E, Döring F, Veh RW, Sheng M, Karschin A. Neuronal inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels differentially couple to PDZ proteins of the PSD-95/SAP90 family. *J Neurosci* 2000;**20**:156-162.
- Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;**525**:285-298.
- Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;**85**:1205-1253.
- Nernst W. Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusion. *Z Phys Chem* 1888;613-637.
- Newey SE, Benson MA, Ponting CP, Davies KE, Blake DJ. Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr Biol*. 2000;**10**:1295-8.
- Nichols CG, Makhina EN, Pearson WL, Sha Q, Lopatin AN. Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circ Res* 1996;**78**:1-7.
- Nichols CG, Singh GK, Grange DK. KATP channels and cardiovascular disease: suddenly a syndrome. *Circ Res*. 2013;**112**(7):1059-72.
- Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985;**316**:443-446.
- Nishida M, MacKinnon R. Structural basis of inward rectification. Cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 2002;**111**:957-965.
- Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current ( $I_{to}$ ) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:12-25.
- Noble D. Electrical properties of cardiac muscle attributable to inward-going (anomalous) rectification. *J Cell Comp Physiol* 1965;**66**:127-136.
- Noda M, Suzuki H, Huma S, Stühmer W. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxotoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* 1989;**259**:213-216.
- Noma A, Trautwein W. Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch* 1978;**377**:193-200.
- Noujaim SF, Auerbach DS, Jalife J. Ventricular fibrillation: dynamics and ion channel determinants. *Circ J*. 2007a;**71** Suppl A:A1-11.
- Noujaim SF, Pandit SV, Berenfeld O, Vikstrom K, Cerrone M, Mironov S, Zugermayr M, Lopatin AN, Jalife J. Up-regulation of the inward rectifier K<sup>+</sup> current ( $I_{K1}$ ) in the mouse heart accelerates and stabilizes rotors. *J Physiol* 2007b;**578**:315-326.

- Noujaim SF, Stuckey JA, Ponce-Balbuena D, Ferrer-Villada T, López-Izquierdo A, Pandit SV, Sánchez-Chapula JA, Jalife J. Structural bases for the different anti-fibrillatory effects of chloroquine and quinidine. *Cardiovasc Res*. 2011;**89**:862–9.
- Nufer O, Hauri HP. ER export: call 14-3-3. *Curr Biol*. 2003;**13**(10):R391-3.
- Núñez L, Barana A, Amorós I, de la Fuente MG, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Rodríguez-García I, Mosquera I, Monserrat L, Delpón E, Caballero R, Castro-Beiras A, Tamargo J. p.D1690N Nav1.5 rescues p.G1748D mutation gating defects in a compound heterozygous Brugada syndrome patient. *Heart Rhythm*. 2013;**10**:264-72.
- Nygren A, Lomax AE, Giles WR. Optical mapping system for recording action potential durations in adult mouse left and right atrium. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2004;**5**:3576-7.
- O'Reilly, J. P., Wang, S.-Y., Kallen, R. G., & Wang, G. K. Comparison of slow inactivation in human heart and rat skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel chimaeras. *The Journal of Physiology*. 1999;**515**(Pt 1): 61–73.
- Oliva C, Cohen IS, Pennefather P. The mechanism of rectification of iK1 in canine Purkinje myocytes. *J Gen Physiol* 1990;**96**:299-318.
- Olson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A. Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum Mol Genet* 2006;**15**:2185-2191.
- Organ-Darling LE, Vernon AN, Giovanniello JR, Lu Y, Moshal K, Roder K, Li W, Koren G. Interactions between hERG and KCNQ1  $\alpha$ -subunits are mediated by their COOH termini and modulated by cAMP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;**304**(4):H589-99.
- Osterrieder W, Yang QF, Trautwein W. The time course of the muscarinic response to ionophoretic acetylcholine application to the S-A node of the rabbit heart. *Pflügers Arch* 1981;**389**:283-291.
- Ou Y, Stregé P, Miller SM, Makielski J, Ackerman M, Gibbons SJ, Farrugia G. Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem* 2003;**278**:1915–1923.
- Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current ( $I_{to}$ ) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:851-872.
- Oxford GS, Yeh JZ. Interactions of monovalent cations with sodium channels in squid axon. I. Modification of physiological inactivation gating. *J Gen Physiol* 1985;**85**:583-602.
- Panama BK, Lopatin AN. Differential polyamine sensitivity in inwardly rectifying Kir2 potassium channels. *J Physiol* 2006;**571**:287-302.
- Panama BK, McLerie M, Lopatin AN. Heterogeneity of  $I_{K1}$  in the mouse heart. *Am J Physiol* 2007;**293**:H3558-H3567.
- Pandit SV, Berenfeld O, Anumonwo JMB, Zaritski RM, Kneller J, Nattel S, Jalife J. Ionic Determinants of Functional Reentry in a 2-D Model of Human Atrial Cells During Simulated Chronic Atrial Fibrillation. *Biophys. J*. 2005;**88**:3806–3821.
- Pandit SV, Warren M, Mironov S, Tolkacheva EG, Kalifa J, Berenfeld O, Jalife J. Mechanisms Underlying the Antifibrillatory Action of Hyperkalemia in Guinea Pig Hearts. *Biophys. J*. 2010;**98**:2091–2101.
- Pandit SV, Zlochiver S, Filgueiras-Rama D, Mironov S, Yamazaki M, Ennis SR, Noujaim S, Workman AJ, Berenfeld O, Kalifa J, Jalife J. Targeting Atrio-Ventricular Differences in Ion Channel Properties for Terminating Acute Atrial Fibrillation in Pigs. *Cardiovasc. Res*. 2011;**89**:843–51.
- Pandit SV, Jalife J. Rotors and the dynamics of cardiac fibrillation. *Circ Res*. 2013;**112**:849-62.
- Papadatos GA, Wallerstein PM, Head CE, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez RC, Trezise AE, Huang CL, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene Scn5a. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;**99**:6210-6215.
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 1987;**237**:749-753.
- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 1991;**349**:305-310.
- Patel SP, Campbell DL, Strauss HC. Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform. *J Physiol* 2002;**545**:5-11.
- Patlak J, Ortiz M. Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J Gen Physiol* 1985;**86**:89-104.

- Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, Choe S. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 2005;**8**:279-287.
- Pegan S, Arrabit C, Slesinger PA, Choe S. Andersen's syndrome mutation effects on the structure and assembly of the cytoplasmic domains of Kir2.1. *Biochemistry* 2006;**45**:8599-8606.
- Pelleg A, Belardinelli L. Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine: basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res* 1993;**27**:54-61.
- Pérez-Hernández M, Matamoros M, Barana A, Amorós I, Gómez R, Núñez M, Sacristán S, Pinto Á, Fernández-Avilés F, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Pitx2c increases in atrial myocytes from chronic atrial fibrillation patients enhancing IKs and decreasing ICa,L. *Cardiovasc Res*. 2016;**109**:431-41.
- Pérez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-Type calcium channels. *Physiol Rev* 2003;**83**:117-161.
- Périer R, Radecke CM, Vandenberg CA. Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:6240-6244.
- Peters MF, Adams ME, Froehner SC. Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol*. 1997;**138**:81-93.
- Peterson BZ, Lee JS, Mulle JG, Wang Y, de Leon M, Yue DT. Critical determinants of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys J* 2000;**78**:1906-1920.
- Petitprez S, Zmoos AF, Ogrodnik J, Balse E, Raad N, El-Haou S, Albesa M, Bittihn P, Luther S, Lehnart SE, Hatem SN, Coulombe A, Abriel H. SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circ Res*. 2011;**108**:294-304.
- Piao L, Li J, McLerie M, Lopatin AN. Cardiac I<sub>K1</sub> underlies early action potential shortening during hypoxia in the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 2007a;**43**:27-38.
- Piao L, Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic upregulation of I<sub>K1</sub> in the mouse heart is proarrhythmic. *Basic Res Cardiol* 2007b;**102**:416-428.
- Pinto JM, Boyden PA. Reduced inward rectifying and increased E-4031-sensitive K<sup>+</sup> current density in arrhythmogenic subendocardial Purkinje myocytes from the infarcted heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;**9**:299-311.
- Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL Jr, Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptacek LJ. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's Syndrome. *Cell* 2001;**105**:511-519.
- Poet M, Tauc M, Lingueglia E, Cance P, Poujeol P, Lazdunski M, Counillon L. Exploration of the pore structure of a peptide-gated Na<sup>+</sup> channel. *EMBO J* 2001;**20**:5595-602.
- Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual  $\beta$ -adrenergic responsiveness. *Circ Res* 2001;**88**:1159-1167.
- Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM. Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I<sub>Kr</sub> channels. *J Biol Chem* 2000;**275**:5997-6006.
- Ponting CP. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci*. 1997;**6**:464-8.
- Postema PG, Ritsema van Eck HJ, Opthof T, van Herpen G, van Dessel PF, Priori SG, Wolpert C, Borggrefe M, Kors JA, Wilde AA. I<sub>K1</sub> modulates the U-wave: insights in a 100-year-old enigma. *Heart Rhythm* 2009;**6**:393-400.
- Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA, Guicheney P. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 2002;**91**:e21-e26.
- Pourrier M, Zicha S, Ehrlich J, Han W, Nattel S. Canine ventricular KCNE2 expression resides predominantly in Purkinje fibers. *Circ Res* 2003;**93**:189-191.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. Calcium channel  $\beta$  subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha 1$  subunit. *Nature* 1994;**368**:67-70.
- Preisig-Müller R, Schlichthörl G, Goerge T, Heinen S, Brüggemann A, Rajan S, Derst C, Veh RW, Daut J. Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:7774-7779.



- Priori SG, Napolitano C, Giordano U, Collisani G, Memmi M. Brugada syndrome and sudden cardiac death in children [letter]. *Lancet* 2000;**355**:808-9.
- Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, DeSimoni L, Coltorti F, Bloise R, Keegan R, Cruz Filho FE, Vignati G, Benatar A, DeLogu A. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2002;**106**:69-74.
- Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, Napolitano C, Anumonwo J, di Barletta MR, Gudapakkam S, Bosi G, Stramba-Badiale M, Jalife J. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 2005;**96**:800-807.
- Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang CE, Huikuri H, Kannankeril P, Krahm A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G, Tracy C; Document Reviewers, Ackerman M, Belhassen B, Estes NA 3rd, Fatkin D, Kalman J, Kaufman E, Kirchhof P, Schulze-Bahr E, Wolpert C, Vohra J, Refaat M, Etheridge SP, Campbell RM, Martin ET, Quek SC; Heart Rhythm Society; European Heart Rhythm Association; Asia Pacific Heart Rhythm Society. Executive summary: HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes. *Europace*. 2013;**15**:1389-406.
- Pu J, Wada T, Valdivia C, Chutkow WA, Burant CF, Makielski JC. Evidence of  $K_{ATP}$  channels in native cardiac cells without SUR. *Biophys J* 2001;**80**:863-868.
- Qu Z, Yang Z, Cui N, Zhu G, Liu C, Xu H, Chanchevalap S, Shen W, Wu J, Li Y, Jiang C. Gating of inward rectifier  $K^+$  channels by proton-mediated interactions of N- and C-terminal domains. *J Biol Chem* 2000;**275**:31573-31580.
- Raab-Graham KF, Radeke CM, Vandenberg CA. Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *NeuroReport* 1994;**5**:2501-2505.
- Radicke S, Cotella D, Graf EM, Banse U, Jost N, Varro A, Tseng GN, Ravens U, Wettwer E. Functional modulation of the transient outward current  $I_{to}$  by KCNE  $\beta$ -subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts. *Cardiovasc Res* 2006;**71**:695-703.
- Radicke S, Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Ravens U, Wettwer E, Delpón E. Effects of MiRP1 and DPP6  $\beta$ -subunits on the blockade induced by flecainide of Kv4.3/KChIP2 channels. *Br J Pharmacol* 2008;**154**:774-786.
- Rafizadeh S, Zhang Z, Woltz RL, Kim HJ, Myers RE, Lu L, Tuteja D, Singapuri A, Bigdeli AA, Harchache SB, Knowlton AA, Yarov-Yarovoy V, Yamoah EN, Chiamvimonvat N. Functional interaction with filamin A and intracellular  $Ca^{2+}$  enhance the surface membrane expression of a small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  (SK2) channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;**111**:9989-94.
- Rapsomaniki MA, Kotsantis P, Symeonidou IE, Giakoumakis NN, Taraviras S, Lygerou Z. easyFRAP: an interactive, easy-to-use tool for qualitative and quantitative analysis of FRAP data. *Bioinformatics*. 2012;**28**(13):1800-1.
- Rekas A, Alattia JR, Nagai T, Miyawaki A, Ikura M. Crystal structure of venus, a yellow fluorescent protein with improved maturation and reduced environmental sensitivity. *J Biol Chem*. 2002;**277**:50573-8.
- Remme CA. Connexin43 and Na(V)1.5: partners in crime? *Heart Rhythm* 2012;**9**:608-609.
- Ren XQ, Liu GX, Organ-Darling LE, Zheng R, Roder K, Jindal HK, Centracchio J, McDonald TV, Koren G. Pore mutants of herg and kvlt1 downregulate the reciprocal currents in stable cell lines. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;**299**:H1525-1534.
- Reuter H. Divalent cations as change carriers in excitable membranes. *Prog Biophys Mol Biol* 1973;**26**:1-43.
- Riuró H, Beltran-Alvarez P, Tarradas A, Selga E, Campuzano O, Vergés M, Pagans S, Iglesias A, Brugada J, Brugada P, Vázquez FM, Pérez GJ, Scornik FS, Brugada R. A missense mutation in the sodium channel  $\beta 2$  subunit reveals SCN2B as a new candidate gene for Brugada syndrome. *Hum Mutat*. 2013;**34**(7):961-6.
- Rizzo S, Lodder EM, Verkerk AO, Wolswinkel R, Beekman L, Pilichou K, Basso C, Remme CA, Thiene G, Bezzina CR. Intercalated disc abnormalities, reduced  $Na^{+}$  current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathic changes. *Cardiovasc Res*. 2012;**95**:409-18.
- Roberts R. Genomics and cardiac arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 2006;**47**:9-21.
- Rodríguez-Menchaca AA, Navarro-Polanco RA, Ferrer-Villada T, Rupp J, Sachse FB, Tristani-Firouzi M, Sánchez-Chapula JA. The molecular basis of chloroquine block of the inward rectifier Kir2.1 channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:1364-1368.
- Rohacs T, Chen J, Prestwich GD, Logothetis DE. Distinct specificities of inwardly rectifying  $K^+$  channels

for phosphoinositides. *J Biol Chem* 1999;**274**:36065-36072.

Rohacs T, Lopes CM, Jin T, Ramdya PP, Molnar Z, Logothetis DE. Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:745-750.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;**8**(7):519-29.

Rook MB, Evers MM, Vos MA, Bierhuizen MF. Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovasc Res*. 2012;**93**:12-23.

Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel  $\beta$  subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 2001;**533**:119-125.

Rougier O, Vassort G, Stampfli R. Voltage clamp experiments on frog atrial heart muscle fibres with the sucrose gap technique. *Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1968;**301**:91-108.

Rougier JS, van Bemmelen MX, Bruce MC, Jespersen T, Gavillet B, Apothéloz F, Cordonier S, Staub O, Rotin D, Abriel H. Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;**288**:C692-701.

Rougier JS, Abriel H. Cardiac voltage-gated calcium channel macromolecular complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2016;**1863**:1806-12.

Roux B, MacKinnon R. The cavity and pore helices in the KcsA K<sup>+</sup> channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 1999;**285**:100-102.

Ruan Y, Liu N, Bloise R, Napolitano C, Priori SG. Gating properties of SCN5A mutations and the response to mexiletine in long-QT syndrome type 3 patients. *Circulation* 2007;**116**:1137-44.

Rudy B. Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *J Physiol* 1978;**283**:1-21.

Ruiz-Petrich E, de Lorenzi F, Chartier D. Role of the inward rectifier  $I_{K1}$  in the myocardial response to hypoxia. *Cardiovasc Res* 1991;**25**:17-26.

Ruppersberg JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 1990;**345**:475-476.

Ryan DP, da Silva MR, Soong TW, Fontaine B, Donaldson MR, Kung AW, Jongjaroenprasert W, Liang MC, Khoo DH, Cheah JS, Ho SC, Bernstein HS, Maciel RM, Brown RH Jr, Ptáček LJ. Mutations in potassium channel Kir2.6 cause susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 2010;**140**:88-98.

Saikawa T, Carmeliet E. Slow recovery of the maximal rate of rise ( $V_{max}$ ) of the action potential in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 1982;**394**:90-93.

Sakmann B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K<sup>+</sup> channel in isolated pacemaker cells of mammalian heart. *Nature* 1983;**303**:250-253.

Sakmann B, Trube G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J Physiol* 1984a;**347**:641-657.

Sakmann B, Trube G. Voltage-dependent inactivation of inward-rectifying single-channel currents in guinea-pig heart cell membrane. *J Physiol* 1984b;**347**:659-683.

Samie FH, Berenfeld O, Anumonwo J, Mironov SF, Udassi S, Beaumont J, Taffet S, Pertsov AM, Jalife J. Rectification of the background potassium current: a determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation. *Circ Res* 2001;**89**:1216-1223.

Sánchez-Chapula JA, Salinas-Stefanon E, Torres-Jacome J, Benavides-Haro DE, Navarro-Polanco RA. Blockade of currents by the antimalarial drug chloroquine in feline ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;**297**:437-445.

Sanguinetti M, Jurkiewicz N. Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;**96**:195-215.

Sanguinetti M, Jurkiewicz N. Delayed rectifier outward K<sup>+</sup> current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* 1991;**260**:H393-H399.

Sanguinetti M, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the  $I_{Kr}$  potassium channel. *Cell* 1995;**81**:299-307.

Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT. Spectrum of HERG K<sup>+</sup> channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996a;**93**:2208-2212.

Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of KvLQT1

- and minK (IsK) proteins to form cardiac  $I_{Ks}$  potassium channel. *Nature* 1996b;**384**:80-83.
- Sanguinetti M, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 2006;**440**:463-469.
- Saras J, Heldin CH. PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem Sci.* 1996;21:455-8.
- Sarmast F, Kolli A, Zaitsev A, Parisian K, Dhamoon AS, Guha PK, Warren M, Anumonwo JM, Taffet SM, Berenfeld O, Jalife J. Cholinergic atrial fibrillation: I(K,ACh) gradients determine unequal left/right atrial frequencies and rotor dynamics. *Cardiovasc Res* 2003; **59**:863-873.
- Sato PY, Musa H, Coombs W, Guerrero-Serna G, Patiño GA, Taffet SM, Isom LL, Delmar M. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* 2009;**105**:523-6.
- Sato PY, Coombs W, Lin X, Nekrasova O, Green KJ, Isom LL, Taffet SM, Delmar M. Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circ Res.* 2011;**109**:193-201.
- Saveliev A I, Kourliouros A, Camm J. Primary and secondary prevention of atrial fibrillation with statins and polyunsaturated fatty acids: review of evidence and clinical relevance. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2010;**381**:1-13.
- Scherer D, Kiesecker C, Kulzer M, Gunth M, Scholz EP, Kathöfer S, Thomas D, Maurer M, Kreuzer J, Bauer A, Katus HA, Karle CA, Zitron E. Activation of inwardly rectifying Kir2.x potassium channels by  $\beta_3$ -adrenoceptors is mediated via different signalling pathways with a predominant role of PKC for Kir2.1 and of PKA for Kir2.2. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2007;**375**:311-322.
- Scheuer T. Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;**22**:160-5.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;**9**(7):676-682.
- Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 2000;**19**:332-340.
- Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ. The size of gating charge in wild-type and mutant *Shaker* potassium channels. *Science* 1992;**255**:1712-1715.
- Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999;**23**:20-21.
- Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev.* 2011; **91**:265-325.
- Schotman H, Karhinen L, Rabouille C. dGRASP-mediated noncanonical integrin secretion is required for *Drosophila* epithelial remodeling. *Dev Cell.* 2008;**14**(2):171-82.
- Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002;**90**:939-950.
- Schram G, Pourrier M, Wang Z, White M, Nattel S. Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents. *Circ Res* 2003;**59**:328-338.
- Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005;**74**:739-89.
- Schroer TA. Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;**20**:759-79.
- Schuhmann K, Voelker C, Hofer GF, Pflugelmeier H, Klugbauer N, Hofmann F, Romanin C, Groschner K. Essential role of the  $\beta$  subunit in modulation of C-class L-type  $Ca^{2+}$  channels by intracellular pH. *FEBS Lett* 1997;**408**:75-80.
- Schultz J, Hoffmüller U, Krause G, Ashurst J, Macias MJ, Schmieder P, Schneider-Mergener J, Oschkinat H. Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat Struct Biol.* 1998;**5**:19-24.
- Schulze-Bahr E. Short QT syndrome or Andersen syndrome: yin and yang of Kir2.1 channel dysfunction. *Circ Res* 2005;**96**:703-704.
- Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR, Bloise R. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2000;**343**:262-267.
- Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt

- G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2001;**103**:89-95.
- Schwartz PJ. The congenital long QT syndromes from genotype to phenotype: clinical implications. *J Intern Med*. 2006;**259**:39-47.
- Seiler N. Formation, catabolism and properties of the natural polyamines. En: *Neuropharmacology of polyamines*. Carter C (Eds.). Academic Press;1994:1-30.
- Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;**81**:133-176.
- Sejersted OM, Sjogaard G. Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev* 2000;**80**:1411-1481.
- Serodio P, Demiera EVS, Rudy B. Cloning of a novel component of A-type  $K^+$  channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J Neurophysiol* 1996;**75**:2174-2179.
- Shah AK, Cohen IS, Datyner NB. Background  $K^+$  current in isolated canine cardiac Purkinje myocytes. *Biophys J* 1987;**52**:519-525.
- Shen W, Kurachi Y. Mechanisms of adenosine mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin Proc* 1995;**70**:274-291.
- Shen MJ, Choi EK, Tan AY, Lin SF, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS. Neural mechanisms of atrial arrhythmias. *Nat Rev Cardiol* 2012;**9**:30-39.
- Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci*. 2001;**24**:1-29.
- Shibata EF, Drury T, Refsun H, Aldrerte V, Giles WR. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol* 1989;**257**:H1773-H1781.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:557-594.
- Shimizu W, Matsuo K, Kokubo Y, Satomi K, Kurita T, Noda T, Nagaya N, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Inamoto N, Akahoshi M, Tomoike H. Sex hormone and gender difference--role of testosterone on male predominance in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2007;**18**:415-21.
- Shin HG, Lu Z. Mechanism of the voltage sensitivity of IRK1 inward-rectifier  $K^+$  channel block by the polyamine spermine. *J Gen Physiol* 2005;**125**:413-426.
- Shinagawa Y, Satoh H, Noma A. The sustained inward current and inward rectifier  $K^+$  current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J Physiol* 2000;**523**:593-605.
- Shorter J, Watson R, Giannakou ME, Clarke M, Warren G, Barr FA. GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system. *EMBO J*. 1999;**18**(18):4949-60.
- Shy D, Gillet L, Abriel H. Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochim Biophys Acta*. 2013;**1833**:886-94.
- Shy D, Gillet L, Ogrodnik J, Albesa M, Verkerk AO, Wolswinkel R, Rougier JS, Barc J, Essers MC, Syam N, Marsman RF, van Mil AM, Rotman S, Redon R, Bezzina CR, Remme CA, Abriel H. PDZ domain-binding motif regulates cardiomyocyte compartment-specific NaV1.5 channel expression and function. *Circulation*. 2014a;**130**:147-60.
- Shy D, Gillet L, Abriel H. Targeting the sodium channel NaV1.5 to specific membrane compartments of cardiac cells: not a simple task! *Circ Res*. 2014b;**115**:901-3.
- Shyng SL, Sha Q, Ferrigni T, Ipatin AN, Nichols CG. Depletion of intracellular polyamines relieves inward rectification of potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:12014-12019.
- Shyng SL, Cukras CA, Harwood J, Nichols CG. Structural determinants of  $PIP_2$  regulation of inward rectifier  $K_{ATP}$  channels. *J Gen Physiol* 2000;**116**:599-608.
- Siegelbaum SA, Tsien RW, Kass RS. Role of intracellular calcium in the transient outward current of calf Purkinje fibers. *Nature* 1977;**269**:611-613.
- Sigworth FJ. Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 1994;**27**:1-40.
- Skanes AC, Mandapati R, Berenfeld O, Davidenko JM, Jalife J. Spatiotemporal periodicity during atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 1998;**98**: 1236-1248.

- Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 1996;**379**:833-836.
- Smits JP, Koopmann TT, Wilders R, Veldkamp MW, Opthof T, Bhuiyan ZA, Mannens MM, Balser JR, Tan HL, Bezzina CR, Wilde AA. A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;**38**:969-981.
- Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart: Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 1993;**101**:513-543.
- Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:377-390.
- Soh H, Goldstein SA.  $I_{SA}$  channel complexes include four subunits each of DPP6 and Kv4.2. *J Biol Chem* 2008;**283**:15072-15077.
- Sottas V, Abriel H. Negative-dominance phenomenon with genetic variants of the cardiac sodium channel Nav1.5. *Biochim Biophys Acta*. 2016;**1863**:1791-8.
- Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti M. Class III anti-arrhythmic drugs blocks HERG, a human cardiac delayed rectifier  $K^+$  channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res* 1996a;**78**:499-503.
- Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC. Fast inactivation causes rectification of the  $I_{Kr}$  channel. *J Gen Physiol* 1996b;**107**:611-619.
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori SG, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000;**102**:1178-1185.
- Splawski I, Timothy KW, Tateyama M, Clancy CE, Malhotra A, Beggs AH, Cappuccino FP, Sagnella GA, Kass RS, Keating MT. Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia. *Science* 2002;**297**:1333-1336.
- Standen NB, Stanfield PR. Potassium depletion and sodium block of potassium currents under hyperpolarization in frog sartorius muscle. *J Physiol* 1979;**294**:497-520.
- Stanfield PR, Davies NW, Shelton PA, Sutcliffe MJ, Khan IA, Brammar WJ, Conley EC. A single aspartate residue is involved in both intrinsic gating and blockage by  $Mg^{2+}$  of the inward rectifier, IRK1. *J Physiol* 1994;**478**:1-6.
- Stanfield PR, Nakajima S, Nakajima Y. Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier  $K^+$  channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002;**145**:47-179.
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 1989;**339**:597-603.
- Sunami A, Fan Z, Nakamura F, Naka M, Tanaka T, Sawanobori T, Hiraoka M. The catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase directly inhibits sodium channel activities in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch*. 1991;**419**:415-7.
- Swartz MF, Fink GW, Lutz CJ, Taffet SM, Berenfeld O, Vikstrom KL, Kasproicz K, Bhatta L, Puskas F, Kalifa J, Jalife J. Left vs. right atrial difference in dominant frequency,  $K(+)$  channel transcripts, and fibrosis in patients developing atrial fibrillation after cardiac surgery. *Heart Rhythm* 2009;**6**: 1415-1422.
- Takahashi N, Morishige K, Jahangir A, Yamada M, Findlay I, Koyama H, Kurachi Y. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a second class of inward rectifier potassium channels in the mouse brain. *J Biol Chem* 1994;**269**:23274-23279.
- Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 1988;**242**:1042-1045.
- Tamargo J. Drug-induced torsades de pointes: from molecular biology to bedside. *Jpn J Pharmacol* 2000;**83**:1-19.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;**62**:9-33.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Delpón E.  $I_{Kur}/Kv1.5$  channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;**18**:399-416.
- Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balser JR. A sodium- channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 2001;**409**:1043-1047.
- Tan HL, Kupersmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AA, Anderson ME, Balser JR. A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature*. 2002;**415**(6870):442-7.

- Tao X, Avalos JL, Chen J, MacKinnon R. Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 2009;**326**:1668-74.
- Tateyama M, Kurokawa J, Terrenoire C, Rivolta I, Kass RS. Stimulation of protein kinase C inhibits bursting in disease-linked mutant human cardiac sodium channels. *Circulation*. 2003;**107**:3216-22.
- Terlau H, Heinemann SH, Stuhmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 1991;**293**:93-96.
- Terzic A, Vivaudou M, Moreau C, Olson TM, Jahangir A, Zingman LV, Alekseev AE. Channelopathies of cardiac inwardly rectifying potassium channels. En: *Electrical diseases of the heart: genetics, mechanisms, treatment, prevention*. Gussak I, Antzelevitch C. Springer-Verlag 2008:207-217.
- Tester DJ, Arya P, Will M, Haglund CM, Farley AL, Makielski JC, Ackerman MJ. Genotypic heterogeneity and phenotypic mimicry among unrelated patients referred for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia genetic testing. *Heart Rhythm* 2006;**3**:800-805.
- Tikhonov DB, Zhorov BS. Molecular modeling of benzothiazepine binding in the L-type calcium channel. *J Biol Chem*. 2008;**283**:17594-604.
- Tikhonov DB, Zhorov BS. Structural model for dihydropyridine binding to L-type calcium channels. *J Biol Chem*. 2009;**284**:19006-17.
- Töpert C, Döring F, Wischmeyer E, Karschin C, Brockhaus J, Ballanyi K, Derst C, Karschin A. Kir2.4: a novel K<sup>+</sup> inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei. *J Neurosci* 1998;**18**:4096-4105.
- Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwiecinski H, Fidzianska A, Plaster N, Fu YH, Ptacek LJ, Tawil R. Functional and clinical characterization of *KCNJ2* mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest*. 2002;**110**:381-388.
- Tristani-Firouzi M y Etheridge SP. Kir 2.1 channelopathies: the Andersen-Tawil syndrome. *Pflugers Arch*. 2010;**460**:289-294.
- Tsai TD, Shuck ME, Thompson DP, Bienkowski MJ, Lee KS. Intracellular H<sup>+</sup> inhibits a cloned rat kidney outer medulla K<sup>+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 1995;**268**:C1173-C1178.
- Tucker SJ, Pessia M, Adelman JP. Muscarine-gated K<sup>+</sup> channel: Subunit stoichiometry and structural domains essential for G protein stimulation. *Am J Physiol* 1996;**271**:H379-H385.
- Ueda K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A, Tester DJ, Vatta M, Farrugia G, Ackerman MJ, Makielski JC. Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:9355-9360.
- Ulbricht W. Sodium channel inactivation: Molecular determinants and modulation. *Physiol Rev* 2005;**85**:1271-1301.
- Undrovinas AI, Shander GS, Makielski JC. Cytoskeleton modulates gating of voltage-dependent sodium channel in heart. *Am J Physiol*. 1995;**269**(2):H203-14.
- Vaidyanathan R, Taffet SM, Vikstrom KL, Anumonwo JM. Regulation of cardiac inward rectifier potassium current (I(K1)) by synapse-associated protein-97. *J Biol Chem*. 2010;**285**:28000-9.
- Vaidyanathan R, Vega AL, Song C, Zhou Q, Tan BH, Berger S, Makielski JC, Eckhardt LL. The interaction of caveolin 3 protein with the potassium inward rectifier channel Kir2.1: physiology and pathology related to long qt syndrome 9 (LQT9). *J Biol Chem*. 2013;**288**:17472-80.
- Valdivia CR, Tester D, Rok BA, Porter CB, Munger TM, Jahangir A, Makielski JC, Ackerman M. A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovasc Res*. 2004;**62**(1):53-62.
- Valdivia CR, Ueda K, Ackerman MJ, Makielski JC. GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;**297**:1446-52.
- Valenzuela C, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ. Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys J* 1995;**69**:418-427.
- Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE. Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol*. 2004;**58**:189-200.
- Van Bemmelen MX, Rougier JS, Gavillet B, Apothéoz F, Daidié D, Tateyama M, Rivolta I, Thomas MA, Kass



- RS, Staub O, Abriel H. Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ Res*. 2004;**95**:284-91.
- Van Der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol*. 1993;**122**(3):553-63.
- Van Norstrand DW, Valdivia CR, Tester DJ, Ueda K, London B, Makielski JC, Ackerman JC. Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation* 2007;**116**:2253-2259.
- Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;**80**:772-781.
- Vandenberg CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:2560-2564.
- Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Delpón E. Effects of atorvastatin and simvastatin on atrial plateau currents. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**42**:931-945.
- Vaquero M, Calvo D, Jalife J. Cardiac fibrillation: from ion channels to rotors in the human heart. *Heart Rhythm* 2008;**5**:872-9.
- Varro A, Nanasi PP, Lathrop DA. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol Scand* 1993;**149**:133-142.
- Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ, Towbin JA. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 2006;**114**:2104-2112.
- Veeraraghavan R, Lin J, Hoeker GS, Keener JP, Gourdie RG, Poelzing S. Sodium channels in the Cx43 gap junction perinexus may constitute a cardiac ephapse: an experimental and modeling study. *Pflugers Arch* 2015;**467**(10):2093-105.
- Veerman CC, Wilde AA, Lodder EM. The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product NaV1.5: Role in physiology and pathophysiology. *Gene* 2015;**573**(2):177-87.
- Veldkamp MW, Viswanathan PC, Bezzina C, Baartscheer A, Wilde AA, Balser JR. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na<sup>+</sup> channel. *Circ Res* 2000;**33**:5-15.
- Verkerk AO, Remme CA, Schumacher CA, Scicluna BP, Wolswinkel R, de Jonge B, Bezzina CR, Veldkamp MW. Functional Nav1.8 channels in intracardiac neurons: the link between SCN10A and cardiac electrophysiology. *Circ Res*. 2012;**111**:333-43.
- Vikstrom KL, Vaidyanathan R, Levinsohn S, O'Connell RP, Qian Y, Crye M, Mills JH, Anumonwo JM. SAP97 regulates Kir2.3 channels by multiple mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;**297**:H1387-97.
- Vilin YY, Makita M, George AL, Ruben PC. Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channel. *Biophys J* 1999;**77**:1384-1393.
- Vinke FP, Grieve AG, Rabouille C. The multiple facets of the Golgi reassembly stacking proteins. *Biochem J*. 2011;**433**(3):423-33.
- Virag L, Iost N, Opincariu M, Szolnoky J, Szecsi J, Bogats G, Szenohradszky P, Varro A, Papp JG. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2001;**49**:790-797.
- Voigt N, Trausch A, Knaut M, Matschke K, Varró A, Van Wagoner DR, Nattel S, Ravens U, Dobrev D. Left-to-right atrial inward rectifier potassium current gradients in patients with paroxysmal versus chronic atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;**3**:472-80.
- Wada K, Yokotani N, Hunter C, Doi K, Wenthold RJ, Shimasaki S. Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:197-201.
- Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel  $\beta$ 1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 1998;**19**:366-370.
- Wang C, Hennessey JA, Kirkton RD, Wang C, Graham V, Puranam RS, Rosenberg PB, Bursac N, Pitt GS. Fibroblast growth factor homologous factor 13 regulates Na<sup>+</sup> channels and conduction velocity in murine hearts. *Circ Res*. 2011;**109**:775-82.
- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995;**80**:805-811.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar

- to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993;**73**:1061-1076.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994;**28**:1540-1546.
- Wang Z, Kiehn J, Yang Q, Brown AM, Wible BA. Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kv $\beta$ 1 subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:28311-28317.
- Wang Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S. Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation* 1998;**98**:2422-2428.
- Wang J, Myers CD, Robertson GA. Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol* 2000;**115**:749-758.
- Wang H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K, Chai J. Structural basis for modulation of Kv4 K<sup>+</sup> channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci* 2007;**10**:32-39.
- Warren M, Guha PK, Berenfeld O, Zaitsev A, Anumonwo JM, Dhamoon AS, Bagwe S, Taffet SM, Jalife J. Blockade of the inward rectifying potassium current terminates ventricular fibrillation in the guinea pig heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;**14**:621-631.
- Watanabe S, Kusama-Eguchi K, Kobayashi H, Igarashi K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem* 1991;**266**:20803-20809.
- Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld AC, Pfeufer A, Kääh S, Wichmann HE, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR. Sodium channel  $\beta$ 1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 2008;**118**:2260-8.
- Watanabe H, Darbar D, Kaiser DW, et al. Mutations in sodium channel  $\beta$  1- and  $\beta$  2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 2009;**2**:268 - 275.
- Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, et al. Electrocardiographic characteristics and SCN5A mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011;**4**:874-881.
- Wei J, Wang D, Alings M, Fish F, Wathen M, Roden D, George A Jr. Congenital long-QT syndrome caused by a novel mutation in a conserved acidic domain of the cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Circulation* 1999;**99**:3165-3171.
- Weidmann S. The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol* 1955a;**127**:213-224.
- Weidmann S. Rectifier properties of Purkinje fibers. *Am J Physiol* 1955b;**183**:671.
- Westfall MV, Rust EM, Metzger JM. Slow skeletal troponin I gene transfer, expression, and myofilament incorporation enhances adult cardiac myocyte contractile function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:5444-9.
- Wettwer E, Amos G, Gath J, Zerkowski HR, Reidemeister JG, Ravens U. Transient outward current in human and rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1993;**27**:1662-1669.
- Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* 1994;**75**:473-482.
- Whicher JR, MacKinnon R. Structure of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science*. 2016;**353**(6300):664-9.
- Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Taglialatela M, Brown AM. Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from human atrium. *Circ Res* 1995;**76**:343-350.
- Wible BA, Yang Q, Kuryshv YA, Accili EA, Brown AM. Cloning and expression of a novel K<sup>+</sup> channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem* 1998;**273**:11745-11751.
- Wible BA, Wang L, Kuryshv YA, Basu A, Haldar S, Brown AM. Increased K<sup>+</sup> efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3 $\beta$  in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002;**277**:12852-12862.
- Wickman K, Nemec J, Gendler SJ, Clapham DE. Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 1998;**20**:103-114.
- Wiener N, Rosenblueth A. The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network of connected excitable elements, specifically in cardiac muscle. *Arch Inst Cardiol Mex*. 1946;**16**:205-65.
- Wijffels MC, Dorland R, Mast F, Allessie MA. Widening of the excitable gap during pharmacological



cardioversion of atrial fibrillation in the goat: effects of cibenzoline, hydroquinidine, flecainide, and D-sotalol. *Circulation* 2000;**102**: 260–267.

Wilde AA, Brugada R. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circ Res*. 2011;**108**(7):884–97.

Wilde AA, Behr ER. Genetic testing for inherited cardiac disease. *Nat Rev Cardiol*. 2013;**10**(10):571–83.

Wilde AA, Postema PG. Bringing home the bacon? The next step in cardiac sodium channelopathies. *J Clin Invest*. 2015;**125**:99–101.

Willis BC, Ponce-Balbuena D, Jalife J. Protein assemblies of sodium and inward rectifier potassium channels control cardiac excitability and arrhythmogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;**308**:1463–73.

Winfree AT. When Time Breaks Down: The Three-Dimensional Dynamics of Electrochemical Waves and Cardiac Arrhythmias. *Princeton University Press* 1987.

Wiseman RL, Haynes CM, Ron D. SnapShot: The unfolded protein response. *Cell*. 19;**140**(4):590–590.e2.

Wissmann R, Baukrowitz T, Kalbacher H, Kalbitzer HR, Ruppersberg JP, Pongs O, Antz C, Fakler B. NMR structure and functional characteristics of the N-terminus of the potassium channel  $\beta$ -subunit Kv $\beta$ 1.1. *J Biol Chem* 1999;**274**:35521–35525.

Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:226–235.

Wu G, Ai T, Kim JJ, Mohapatra B, Xi Y, Li Z, Abbasi S, Purejav E, Samani K, Ackerman MJ, Qi M, Moss AJ, Shimizu W, Towbin JA, Cheng J, Vatta M.  $\alpha$ -1-Syntrophin mutation and the long-QT syndrome: A disease of sodium channel disruption. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;**1**:193–201.

Wu H, Reissner C, Kuhlendahl S, Coblenz B, Reuver S, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC. Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. *EMBO J*. 2000;**19**(21):5740–51.

Wu J, Lipsius S. Effects of extracellular  $Mg^{2+}$  on T- and L-Type  $Ca^{2+}$  currents in single atrial myocytes. *Am J Physiol* 1990;**259**:H1842–H1850.

Wu L, Yong SL, Fan C, Ni Y, Yoo S, Zhang T, Zhang X, Obejero-Paz CA, Rho HJ, Ke T, Szafranski P, Jones SW, Chen Q, Wang QK. Identification of a new co-factor, MOG1, required for the full function of cardiac

sodium channel Nav 1.5. *J Biol Chem*. 2008;**283**:6968–78.

Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, Zhou Q, Yang Y, Liu Y, Liu B, Zhu Q, Zhou Y, Lin J, Liang B, Li L, Dong X, Pan Z, Wang R, Wan H, Qiu W, Xu W, Eurlings P, Barhanin J, Chen Y. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**332**:1012–1019.

Xie LH, Takano M, Noma A. Development of inwardly rectifying  $K^+$  channel family in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1997;**272**:H1741–H1750.

Xie LH, John SA, Weiss JN. Inward rectification by polyamines in mouse Kir2.1 channels: synergy between blocking components. *J Physiol* 2003;**550**:67–82.

Xie LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. *J Physiol* 2008;**586**:1833–1848.

Xin Liu G, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seeböhm G, Brüggemann A, Kummer W, Veh RW, Daut J, Preisig-Müller R. Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier  $K^+$  channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 2001;**532**:115–126.

Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Reviews* 1998;**50**:723–757.

Yamazaki M, Vaquero LM, Hou L, Campbell K, Zlochiver S, Klos M, Mironov S, Berenfeld O, Honjo H, Kodama I, Jalife J, Kalifa J. Mechanisms of stretch-induced atrial fibrillation in the presence and the absence of adrenergic stimulation: interplay between rotors and focal discharges. *Heart Rhythm* 2009;**6**:1009–1017.

Yamazaki M, Honjo H, Ashihara T, Harada M, Sakuma I, Nakazawa K, Trayanova N, Horie M, Kalifa J, Jalife J, Kamiya K, Kodama I. Regional cooling facilitates termination of spiral-wave reentry through unpinning of rotors in rabbit hearts. *Heart Rhythm*. 2012;**9**:107–14.

Yan J, Wen W, Xu W, Long JF, Adams ME, Froehner SC, Zhang M. Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of alpha-syntrophin. *EMBO J*. 2005;**24**: 3985–95.

Yan DH, Nishimura K, Yoshida K, Nakahira K, Ehara T, Igarashi K, Ishihara K. Different intracellular polyamine concentrations underlie the difference in the inward rectifier  $K^+$  currents in atria and ventricles of the guinea-pig heart. *J Physiol* 2005;**563**:713–724.

- Yang NB, Horn R. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channel. *Neuron* 1995a;**15**:213-218.
- Yang T, Kupersmidt S, Roden DM. Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 1995b;**77**:1246-1253.
- Yang N, George AL Jr, Horn R. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 1996;**16**:113-122.
- Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, Liang B, Lin J, Liu Y, Liu B, Zhou Q, Zhang D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004;**75**:899-905.
- Yarbrough TL, Lu T, Lee HC, Shibata EF. Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ Res*. 2002;**90**:443-9.
- Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science* 1991;**251**:939-942.
- Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002;**419**:35-42.
- Yeola SW, Rich TC, Uebele VN, Tamkun MM, Snyders DJ. Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ Res* 1996;**78**:1105-1114.
- Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;**274**:C25-C37.
- Yool AJ, Schwarz TL. Alteration of ionic selectivity of a K<sup>+</sup> channel by mutation of the H5 region. *Nature* 1991;**349**:700-704.
- Yu SP, Kerchner GA. Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* 1998;**52**:612-617.
- Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;**99**:6047-52.
- Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology* 2003;**4**:207.1-207.7.
- Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009;**324**:797-801.
- Yuan W, Ginsburg K, Bers D. Comparison of sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol* 1986;**493**:733-746.
- Yuan H, Michelsen K, Schwappach B. 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Bio* 2003;**13**:638-646.
- Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev*. 2015;**67**:821-70.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000;**101**:25-33.
- Zaritsky JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT, Schwarz TL. Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in K<sup>+</sup>-mediated vasodilation. *Circ Res* 2000;**87**:160-166.
- Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K<sup>+</sup> current (I<sub>K1</sub>) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 2001;**533**:697-710.
- Zaza A, Rocchetti M, Brioschi A, Cantadori A, Ferroni A. Dynamic Ca<sup>2+</sup>-induced inward rectification of K<sup>+</sup> current during the ventricular action potential. *Circ Res* 1998;**82**:947-956.
- Zhabotinsky AM. Periodic course of the oxidation of malonic acid in a solution (Studies on the kinetics of Beolusov's reaction). *Biofizika*. 1964;**9**:306-11.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 1994;**372**:97-100.
- Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, January CT. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res*. 1999;**84**:989-98.

Zhang M, Jiang M, Tseng GN. MinK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as  $\beta$  subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res* 2001;**88**:1012-1019.

Zhang L, Benson DW, Tristani-Firouzi M, Ptacek LJ, Tawil R, Schwartz PJ, George AL Jr, Horie M, Andelfinger G, Snow GL, Fu YH, Ackerman MJ, Vincent GM. Electrocardiographic features in Andersen-Tawil syndrome patients with KCNJ2 genotype. *Circulation* 2005;**111**:2720-2726.

Zhang Y, Wang T, Ma A, Zhou X, Gui J, Wan H, Shi R, Huang C, Grace AA, Huang CL, Trump D, Zhang H, Zimmer T, Lei M. Correlations between clinical and physiological consequences of the novel mutation R878C in a highly conserved pore residue in the cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Acta Physiol (Oxf)* 2008;**194**(4):311-23.

Zhang Z, Zhao Z, Liu Y, Wang W, Wu Y, Ding J. Kinetic model of Nav1.5 channel provides a subtle insight into slow inactivation associated excitability in cardiac cells. *PLoS One*. 2013;8:e64286.

Zhou J, Jeron A, London B, Han X, Koren G. Characterization of a slowly inactivating outward current in adult mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 1998;**83**:806-814.

Zhou J, Shin HG, Yi J, Shen W, Williams CP, Murray KT. Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circ Res*. 2002;**91**:540-6.

Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 2001;**411**:657-661.

Zhou Y, Mackinnon R. The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol* 2003;**333**:965-975.

Zhou X, Borén J, Akyürek LM. Filamins in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*. 2007;**17**:222-9.

Ziane R, Huang H, Moghadaszadeh B, Beggs AH, Levesque G, Chahine M. Cell membrane expression of cardiac sodium channel Na(v)1.5 is modulated by alpha-actinin-2 interaction. *Biochemistry*. 2010;**49**(1):166-78.

Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 1999;**399**:159-162.

## **VIII. PUBLICACIONES**



Los resultados presentados en esta TESIS DOCTORAL están publicados (o pendientes de publicación) en los siguientes artículos:

1. Matamoros M\*, Pérez-Hernández M\*, Guerrero-Serna G, Amorós I, Barana A, Núñez M, Ponce-Balbuena D, Sacristán S, Gómez R, Tamargo J, Caballero R, Jalife J, Delpón E. Nav1.5 N-terminal domain binding to  $\alpha 1$ -syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovasc Res* 2016;110:279-90.
2. Pérez-Hernández M\*, Matamoros M\*, Amorós I , Alfayate S, Nieto-Marín P, G. Utrilla R, Tinaquero D, De Andrés R, Ponce-Balbuena D, Willis C, Jiménez E, Guerrero-Serna G, , M da Rocha A, Campbell K, Herron T, Díez-Guerra J, Tamargo J, Jalife J, Caballero R, Delpón E. The trafficking-defective Nav1.5 mutants can concomitantly retain Kir2.1/2.2 channels and decrease the cardiac inward rectifier potassium current ( $I_{K1}$ ). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017. PENDIENTE DE REVISIÓN.
3. Pérez-Hernández M\*, Matamoros M\*, Amorós I , Alfayate S, Nieto-Marín P, G. Utrilla R, Tinaquero D, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Routes and characteristics of the internalization process of Nav1.5-Kir2.1 channel complexes. *Frontiers* 2017. POR INVITACIÓN.
4. Ponce-Balbuena D, Guerrero-Serna G, Valdivia C, Caballero R, Pérez-Hernández M, Matamoros M, Díez-Guerra J, Jiménez E, Monteiro da Rocha A, Herron T, Campell K, Willis C, Alvarado F, Zarzoso M, Ramirez R, Kaur K, Valdivia H, Delpón E, Jalife J. Cardiac Kir2.1 and Nav1.5 channels traffic together to the sarcolemma to control excitability and arrhythmogenesis. *Nature commun* 2017. PENDIENTE DE REVISIÓN.

